

Aus der Medizinischen Klinik I, Klinikum Großhadern,

der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. G. Riecker

REOVIRUSMYOCARDITIS

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Elisabeth Stangl

aus

München

Jahr

1988

Aus der Medizinischen Klinik / Klinik für Gynäkologie

von Dr. med. Dr. h. c. h. Dr. med. Dr. h. c. h. Dr. med. Dr. h. c. h.

Leipzig, den 1. 10. 1900

Sehr geehrte Damen und Herren!



Die Bibliothek der Universitätsbibliothek Leipzig

Leipzig, den 1. 10. 1900

Sehr geehrte Damen und Herren!

Sehr geehrte Damen und Herren!

Sehr geehrte Damen und Herren!

Sehr geehrte Damen und Herren!

Sehr geehrte Damen und Herren!

Sehr geehrte Damen und Herren!

Sehr geehrte Damen und Herren!



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Klinik I, Klinikum Großhadern,

der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. G. Riecker

REOVIRUSMYOCARDITIS

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Elisabeth Stangl

aus

München

Jahr

1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. J. Zähringer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Riecker
Prof. Dr. H. Wolf

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: entfällt

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.1988

DANKSAGUNG

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Priv.-Doz. Dr. J. Zähringer verpflichtet, der es mir großzügigerweise ermöglichte, das Thema des DFG-unterstützten Forschungsvorhabens in eine Promotion umzuwandeln.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. G. Hübner, der freundlicherweise die elektronenmikroskopischen Untersuchungen durchführte und mir die hervorragenden Photographien überließ.

Außerdem spreche ich Herrn Priv.-Doz. Dr. K. Werdan meinen Dank aus für die Unterstützung bei der Präparation neonataler Mausherzmuskelzellen, und ebenso Fr. Dr. I. Ziegler vom Institut für Hämatologie der GSF für die Hilfestellung bei der Infektion der Zellen mit Reovirus Typ 3.

Ferner möchte ich Frau R. Kremer danken für die Erstellung des vorliegenden Skriptums und auch allen meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor für ihre guten Ratschläge und die Unterstützung bei der Arbeit.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Zähringer, J., Stangl, E., Aschauer, W., and Van der Walt, M. (1985).
Virus Myocarditis: Molecular Hybridization Allows the Detection of
Virus-RNA in Heart Muscle after Virus Infection. *J. Mol. Cell. Car-
diol* **17**, 83-85

Stangl, E., Aschauer, W., Zähringer, J., and Hübner, G. (1986).
Reovirus myocarditis. *Eur. Heart J.* **7** (Suppl. E), in press

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1 Reoviren, ein allgemeiner Überblick	1
1.2 Der Aufbau der Reoviren	2
1.3 Reovirusproteine	4
1.4 Transkription und Translation der Reoviren	7
1.5 Der replikative Zyklus des Serotyps 3 (Stamm Dearing)	8
1.6 Aufgabenstellung	11
2. MATERIALIEN	12
2.1 Tiere	12
2.2 Reovirus Typ 3 (Dearing)	12
2.3 Maus- ($\alpha + \beta$)-Interferon	12
2.4 Chemikalien und andere Materialien	12
3. METHODEN	15
3.1 Isolierung der dsRNS aus gereinigtem Virus	15
3.2 Infektion der Mäuse	15
3.3 Histologische Untersuchungen	15
3.4 Vorbereitung der Herzen für die elektronen- mikroskopische Untersuchung	16
3.5 Isolierung der Gesamt-RNS aus Herzmuskelge- webe von Kontroll- und infizierten Mäusen	16
3.6 Hybridisierung der Gesamt-RNS aus infizier- tem und nicht-infiziertem Herzmuskel gegen ^3H - markierte Reovirus-mRNS	17
3.7 Gabe von Interferon	17

3.8	Translation der Gesamt-RNS in Retikulozyten- lysat	18
3.9	Trennung der Translationsprodukte auf SDS- -Polyacrylamidgelen	18
3.10	Nachweis der Proteine	20
3.10.1	Färbung mit Coomassie Brilliantblau R-250	20
3.10.2	Silberfärbung	20
3.10.3	Fluorographie und Autoradiographie	20
3.11	Transfer der Proteine auf Nitrozellulose- membran	21
3.12	Agarose-Harnstoff-Gele zur Auftrennung der RNS-Segmente	21
3.13	Versuche mit Herzmuskelzellkulturen	22
3.13.1	Präparation neonataler Mausherzmuskelzellen	22
3.13.2	Infektion der Zellen mit Reovirus Typ 3	23
4.	ERGEBNISSE	24
4.1	Vorversuche	24
4.2	Tierversuche	25
4.2.1	Virulenz des Serotyps 3	25
	Der zeitliche Verlauf der Infektion	27
4.2.2.1	Symptome und makroskopische Veränderungen	27
4.2.2.2	Mikroskopische Veränderungen	28
4.2.2.3	Gesamt-RNS aus den Herzen von Kontroll- und infizierten Tieren	34
4.2.2.4	Hybridisierung der Gesamt-RNS gegen ^3H -markierte Reovirus-mRNS	34
4.3	RNS- und Proteinmuster des Typs Dearing	37
4.3.1	Virale Strukturproteine	37
4.3.2	Nachweis virusspezifischer Proteine	39
4.3.2.1	Translation der mRNS in Retikulozytenlysat mit ^{35}S -Methionin	39

4.3.2.2	Immunoblotting der in-vitro synthetisierten Proteine	41
4.4	RNS-Gelelektrophorese zum Nachweis viraler Genom- bzw. mRNS-Segmente	42
4.5	Der Einfluß von Maus-($\alpha+\beta$)-Interferon auf symptomatische Myokarditis	44
4.6	Infektion isolierter Herzmuskelzellen mit Reovirus Typ 3	46
5.	DISKUSSION	51
6.	ZUSAMMENFASSUNG	57
7.	LITERATURVERZEICHNIS	58

VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

	Seite
Tab. 1a Präparation eines 10%- bzw. 12,5%igen Trenngels	19
Tab. 1b Präparation eines 3%igen Sammelgels	19
Tab. 2 Vergleich von Herz-, Milz- und Thymusgewichten der infizierten Tiere im zeitlichen Verlauf der In- fektion mit entsprechenden Gewichten gleichaltri- ger Kontrolltiere	29
Tab. 3 Isolierung der Gesamt-RNS aus Kontroll- und infizierten Herzen	35
Tab. 4 Hybridisierung der Gesamt-RNS aus Kontroll- und infizierten Herzen gegen ^3H -markierte Reovirus- -mRNS	36
Abb. 1 Zuordnung von Genen und Genprodukten am Beispiel des Serotyps 3 (Stamm Dearing)	4
Abb. 2 Die Multiplikation des Serotyps 3 (Stamm Dearing)	11
Abb. 3 Vergleich eines infizierten Herzens 7 Tage nach Infektion mit einem gleichaltrigen Kontrollherzen (3,7-fach)	26
Abb. 4 Kryostat-Schnitt eines infizierten Herzens 7 Tage nach Infektion (Bild oben, 160-fach)	30
Abb. 5 Kryostat-Schnitt eines infizierten Herzens 9 Tage nach Infektion (Bild unten, 160-fach)	30
Abb. 6 Elektronenmikroskopische Aufnahme (18000-fach) eines infizierten Mausmyokards 7 Tage nach Infektion	31
Abb. 7 Elektronenmikroskopische Aufnahme (16000-fach) eines Reovirus-Typ 3-infizierten Herzens 8 Tage nach Infektion	32

Abb. 8	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines infizierten Mausherzens 12 Tage nach Infektion (22000-fach)	33
Abb. 9	Strukturproteine des Serotyps 3 (Dearing)	38
Abb. 10	Autoradiographie der in-vitro synthetisierten Proteine	40
Abb. 11	Agarose-Harnstoff-Gelelektrophorese zur Darstellung von Ribonukleinsäuresegmenten	43
Abb. 12	Elektronenmikroskopaufnahme eines infizierten und Interferon-behandelten Mausmyokards 10 Tage nach Infektion (1875-fach)	45
Abb. 13	Fibroblasten und Myoblasten 5 Tage nach Präparation (475-fach, Bild oben)	49
Abb. 14	Sterbende Myoblasten mit beginnender Lyse (400-fach, Bild unten) 60 Stunden nach Infektion mit Reovirus Typ 3, 5 Tage nach Präparation	49
Abb. 15	Fibroblastoide Zellen (200-fach) 3 Tage nach Präparation (Bild oben)	50
Abb. 16	Reovirus-Typ 3-infizierte Fibroblasten (250-fach) 5 Tage nach Präparation, 3 Tage nach Infektion (Bild unten)	50



ABKÜRZUNGEN

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Bis	N,N'-Methylbisacrylamid
cAMP	Adenosin-3'-5'-monophosphat
CMRL 1415	Nährmedium für Herzmuskelzellen
cpm	Zählausbeute pro Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsRNS	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendinitrioloessigsäure-Dinatriumsalz
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
M	molar
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimolar
µM	mikromolar
mRNS	Boten-RNS ("messenger"-RNS)
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBSAG	PBS mit Glukose
PPO	2,5-Diphenyloxazol
rRNS	ribosomale RNS
RNS	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SVP	subvirales Partikel
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin

Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNS	Transfer-RNS
TS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
V	Volumen

1. EINLEITUNG

1.1 Reoviren, ein allgemeiner Überblick

In den frühen fünfziger Jahren wurden Reoviren erstmals aus dem Respirations- und Gastrointestinaltrakt des Menschen, sowie aus dem Gehirn persistent infizierter Mäuse isoliert (Ramos-Alvarez und Sabin, 1954; Stanley, 1961).

Respiratory enteric orphan virus = Reovirus, bezeichnet nach Sabin, 1959, eine Gruppe von Enteroviren aus der Familie der Picornaviridae, die ursprünglich als Echovirus 10 klassifiziert wurden. Reoviren besitzen ein gemeinsames komplementbindendes Antigen, sind aber aufgrund von Hämagglutinin-Inhibitionstests und Neutralisationstests in drei Hauptgruppen mit jeweiligen Untergruppen einteilbar (Rosen, 1960). Ihre natürlichen Wirte sind Pflanzen, Insekten, und mindestens 60 Arten höherer Vertebraten, einschließlich des Menschen (Rosen, 1962).

Die medizinische Bedeutung der Reoviren ist eher gering. Virusisolate aus Rektalabstrichen wurden bisher bei Kindern mit respiratorischen Symptomen (Pharyngitis, Rhinitis) und enteralen Symptomen (Erbrechen, Diarrhoe), als auch in offensichtlich gesunden Kindern gefunden (Ramos-Alvarez und Sabin, 1954; Jackson und Muldoon, 1973). Verschiedentlich wurden Reoviren aus Patienten mit Enzephalitis, Hepatitis, Meningitis, schwerer Pneumonie oder Tumorerkrankungen wie Burkitt-Lymphom isoliert (Joske et al., 1964; Tillotson und Lerner, 1967; Bell et al., 1966), aber der Nachweis für Reovirus als ätiologisches Agens konnte nicht eindeutig erbracht werden.

Während Reovirusinfektionen in der Regel in erwachsenen Tieren, mit Ausnahme der Affen, stumm verlaufen (Jackson und Muldoon, 1973; Joklik, 1974), reagieren besonders neugeborene oder noch säugende Nagetiere je nach Infektionsroute mit einer generalisierten oder lokalisierten Virose (Stanley, 1974; Zähringer et al., 1985; Stangl et al., 1986), wobei die Sterblichkeitsrate durch Infektion mit dem Serotyp 3

besonders hoch ist. Die Replikation der Reoviren scheint daher nach allgemeiner Auffassung nur in nicht-immunkompetenten oder prädisponierten Wirten stattfinden zu können. Weil sich Reoviren wegen ihrer speziellen Genetik als stabil, leicht zugänglich und nur in relativ geringem Ausmaß als humanpathogen erwiesen, wurden sie in den vergangenen Jahren sehr häufig zum Studium eukaryotischer Wirts-Virus-Interaktionen eingesetzt. Der infektiöse Prozeß umfaßt eine Vielzahl von Schritten wie Viruspenetration, frühe Multiplikation, Ausbreitung, Zell- und Gewebstropismus, Zellschädigung, sowie Wechselwirkungen mit dem Immunsystem und Viruspersistenz.

Wesentliche Teilschritte des replikativen Zyklus der Reoviren waren bereits 1976 aufgeklärt und konnten eindeutig den Funktionen bestimmter viraler Proteine zugeordnet werden (Silverstein, 1976). Den zugrundeliegenden Mechanismus für die Zell- und Gewebsspezifität und damit für die Pathogenese entdeckten erst acht Jahre später drei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen (Epstein et al., 1984; Armstrong et al., 1984; Man Sung Co et al., 1985), indem sie das virale Hämagglutinin als Vermittler für die Viruspenetration über beta-adrenerge Rezeptoren identifizierten.

Trotzdem sind noch wichtige Fragen bezüglich der frühen Multiplikation, der Nukleinsäurereplikation, des posttranslationalen Processing der Virusproteine, der Virusreifung und -persistenz offen.

Ein lückenloser Ablauf des infektiösen Prozesses ist vermutlich aber erst dann rekonstruierbar, wenn unser Einblick in die biologischen Vorgänge der eukaryotischen Organismen umfassender geworden ist.

1.2 Der Aufbau der Reoviren

Der Grundaufbau der tier/humanpathogenen Reoviren ist bei allen drei Serotypen gleich. Das Viruspartikel (Virion) besitzt eine doppelte Kapsidstruktur ohne Lipidmembran (non-enveloped) sowie als Genom zehn doppelsträngige Ribonukleinsäuresegmente. Beide Kapside weisen Durchmesser von 75 nm und 50 nm auf und sind in Unter-

einheiten oder Kapsomeren unterteilt, wobei ihre genaue Anordnung bis heute umstritten ist (Vasquez und Tournier, 1962; Luftig et al., 1972; Palmer und Martin, 1977). Das äußere Kapsid besteht nach Palmer und Martin, 1977, aus 32 morphologischen Untereinheiten, die in T 3 - Symmetrie angeordnet sind. Jede dieser Untereinheiten besitzt die Symmetrie T 9 eines Ikosadeltaeders mit je sechs keilförmigen Kapsomeren, die ihrerseits wiederum aus drei kleineren Untereinheiten gebildet werden. Die Besonderheit dieser Struktur ergeben die gemeinsamen Untereinheiten, die eine genaue Bestimmung des Symmetriesystems sehr erschweren.

Durch Einwirkung von Proteasen wie Trypsin oder Chymotrypsin auf Virionen werden subvirale Partikel (SVPs) freigesetzt, die noch das innere Kapsid mit dem Genom enthalten. Die Symmetrie des inneren Kapsids ist noch weniger definiert als die des äußeren Kapsids, aber von der Oberfläche der subviralen Partikel ragen 12 ikosaedrisch angeordnete Projektionen oder Spikes auf, die hohl sind, und dem Ausschleusen des Partikelinhalts dienen (Luftig et al., 1972)

Das Genom der Reoviren besteht aus zehn diskreten doppelsträngigen Ribonukleinsäureabschnitten, die im Kern vermutlich an einem gemeinsamen Mittelpunkt durch nichtkovalente Proteinbindung miteinander verknüpft sind (Kavenoff et al., 1975). Diese dsRNS-Segmente sind aufgrund ihres Sedimentationsverhaltens in drei Größenklassen einteilbar. Ihre Sedimentationskoeffizienten von 14 S, 12 S und 10,5 S werden als L (large), M (medium) und S (small) Genomsegmente bezeichnet und entsprechen Molekulargewichten von $2,6 \times 10^6$ D, $1,3 \times 10^6$ D und $0,7 \times 10^6$ D oder 4500, 2300 und 1200 Basenpaaren (Bellamy et al., 1967). Die Gesamt-RNS im Kern besteht zu etwa 25 % auch aus kurzen, einzelsträngigen RNS-Molekülen, den sogenannten Oligoadenylaten und 5'-G-terminierten Oligonukleotiden (Bellamy et al., 1972; Nichols et al., 1972). Herkunft und mögliche Funktionen dieser RNS-Moleküle werden im Abschnitt - 1.4 Transkription und Translation der Reoviren - näher erläutert.

1.3 Reovirusproteine

Die zehn dsRNS-Segmente L_{1-3} , M_{1-3} und S_{1-4} kodieren für zehn einzelne messenger-RNS-Spezies l_{1-3} , m_{1-3} und s_{1-4} , deren Translationsprodukte sich in acht virale Strukturproteine und drei Nichtstrukturproteine aufgliedern (Both et al., 1975); McCrae und Joklik, 1978; Samuel, 1983; Mustoe et al., 1978; Ernst und Shatkin, 1985). Molekulargewichtsmuster und -angaben variieren beträchtlich je nach Art der angewandten Separationsmethode (Samuel, 1983). Sekundäre Proteine entstehen entweder durch enzymatische Verdauung oder sind virusinduzierte zelluläre Produkte (Both et al., 1975; Mustoe et al., 1978).

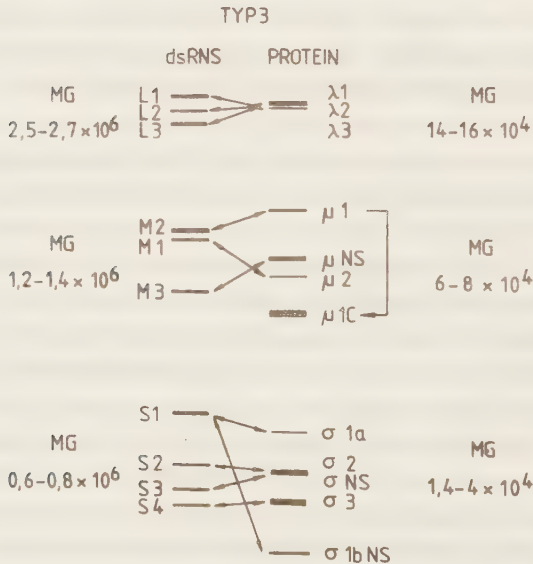


Abb. 1: Zuordnung von Genen und Genprodukten am Beispiel des Serotyps 3 (Stamm Dearing)

Das äußere Kapsid des Reovirions bilden die drei Proteinspezies $\mu 1C$, ein Verdauungsprodukt von $\mu 1$, sowie $\sigma 3$ und $\sigma 1$. Die Hauptmasse des Virions (über 60 %) besteht aus $\mu 1C$ und $\sigma 3$, die in den Kapsomeren als Komplex von $1n \mu 1C$ zu $2n \sigma 3$ vorliegen (Joklik, 1981). Von der kleineren Spezies $\sigma 1$ sind 24 Moleküle pro Virion paarweise am Austrittsort der Projektionen lokalisiert (Lee et al., 1981; Bassel-Duby et al., 1985). Trotz des geringen Anteils am Virion stellt $\sigma 1$ das Schlüsselprotein für die Viruspenetration dar: Es ist identisch mit dem viralen Hämagglutinin, es bewirkt die Bildung von typenspezifischen Neutralisationsantikörpern (Weiner et al., 1977; Weiner und Fields, 1977), es ruft verzögerte Hypersensitivität hervor (Weiner et al., 1980a), es induziert Suppressor-T-Zellen und zytolytische T-Lymphozyten (Fontana und Weiner, 1980; Finberg et al., 1979), es bestimmt die Zell- und Gewebsspezifität (Epstein et al., 1984; Man Sung Co et al., 1985; Weiner et al., 1980b) und damit das Ausmaß der Virulenz.

Das Protein $\mu 1C$ ist aufgrund seiner Protease-Sensitivität ebenfalls an der Zellspezifität und an der Bildung von Suppressor-T-Zellen beteiligt (Rubin und Fields, 1980; Rubin et al., 1981).

Neben der Strukturbildung im äußeren Kapsid konnten dem Protein $\sigma 3$ mit Hilfe biochemischer und genetischer Studien noch drei weitere Funktionen zugewiesen werden: Es besitzt starke Bindungsaffinität zu dsRNS (Huismans und Joklik, 1976), es bewirkt die Inhibition der zellulären RNS- und Proteinsynthese (Sharpe und Fields, 1982) und ist verantwortlich für das Auftreten persistenter Infektionen (Ahmed und Fields, 1982).

Im Kern liegen die sechs Proteinspezies $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$ sowie $\sigma 2$, $\mu 1$ und $\mu 2$ vor. Das innere Kapsid setzt sich vermutlich aus Kapsomeren der Anordnung $1n \lambda 1$ zu $2n \sigma 2$ zusammen. An der Oberfläche des inneren Kapsids sitzen die 12 Spikes, die aus je einem Pentamer von $\lambda 2$ gebildet werden und innen hohl sind. Sie dienen dem Ausschleusen der Transkriptionsprodukte während des replikativen Zyklus (Gillies et al., 1971; Luftig et al., 1972). Da die Spikes auch durch das äußere Kapsid ragen, induziert $\lambda 2$ wie die Oberflächenproteine $\sigma 1$ und $\sigma 3$ die Bildung von neutralisierenden Antikörpern (Joklik, 1981). Durch Markie-

rungsexperimente mit ^{32}P -Guanosintriphosphat (GTP) konnte gezeigt werden, daß $\lambda 2$ eine GTP-abhängige Guanylyltransferaseaktivität besitzt und damit an der cap-Bildung der viralen mRNS-Spezies während der Transkription beteiligt ist (Shatkin et al., 1983). Die Funktion der dsRNS-abhängigen RNS-Polymerase oder auch Transkriptase wird aufgrund von Markierungsexperimenten mit Pyridoxalphosphat oder pH-Optimumvergleich auch den λ -Proteinen zugeordnet, aber bezüglich der Differenzierung zwischen $\lambda 1$, $\lambda 2$ oder $\lambda 3$ liegen konträre Aussagen vor (Morgan und Kingsbury, 1980; Drayna und Fields, 1982). Von den Proteinen $\mu 1$ und $\mu 2$ sind bisher weder die Lage im Kern noch mögliche Funktionen bekannt.

Die beiden Nichtstrukturproteine σNS und μNS sind viruskodierte zelluläre Produkte, die in der frühen Phase, etwa sechs bis acht Stunden nach Infektion nur im Zytoplasma infizierter Zellen nachweisbar sind (Huismans und Joklik, 1976). Über das Protein μNS ist bisher ebenfalls keine Funktion bekannt. Das Protein σNS liegt im Zytoplasma sphärisch oder triangulär mit Sedimentationskoeffizienten zwischen 13-19 S vor. Es zeigt eine poly(C)-abhängige poly(G)-Polymeraseaktivität (Gomatos et al., 1980) und bindet spezifisch ssRNS (Gomatos et al., 1981). Die hypothetische Funktion dieses Proteins als "condensing factor" bei der Virusreifung (Sammeln eines kompletten Sets von Genom-mRNS-Spezies zur Bildung von dsRNS) wird experimentell gestützt durch das Auftreten von temperatursensitiven Mutanten mit defektem σNS -Protein, die daher keine dsRNS bilden können (Ramig et al., 1978). Die starke Bindungsaffinität dieses Proteins zu DNS weist auf eine mögliche Funktion bei der Inhibition der zellulären DNS-Synthese hin (Shelton et al, 1981). Dieselbe Funktion wird allerdings auch für das virale Hämagglutinin diskutiert (Sharpe und Fields, 1981).

Die Entdeckung eines neuen viralen Nichtstrukturproteins mit einem Molekulargewicht von 14 kD liegt erst zwei Jahre zurück. Es entsteht durch Translation der s1-mRNS an dem zweiten Initiationskodon und wird zur Unterscheidung vom zuerst entdeckten $\sigma 1$ - neu $\sigma 1a$ - als $\sigma 1b\text{NS}$ bezeichnet. Dieses Protein scheint an der Modifizierung der

viralen mRNS (Protein-Adenylierung und/oder ADP-Ribosylierung) wesentlich beteiligt zu sein (Mora und Carter, 1983).

1.4 Transkription und Translation der Reoviren

Proteolytische Enzyme verdauen das äußere Kapsid intakter Viruspartikel partiell (in-vivo) oder vollständig (in-vitro) und setzen subvirale Partikel oder Kerne frei (Joklik, 1981). Die Kerne sind gegen einen weiteren Proteaseangriff resistent. Die subviralen Partikel haben die Proteine des äußeren Kapsids $\sigma 1$ und $\sigma 3$ bis auf $\mu 1C$ verloren und sind entweder ebenfalls proteaseresistent (Serotyp 1) oder spalten ein weiteres Protein von etwa 14 kD ab, wobei $\mu 1C$ in δ (60 kD) übergeht (Typ 3, Drayna und Fields, 1982). In beiden Metaboliten sind die Transkriptionsenzyme aktiviert und synthetisieren zehn mRNS-Spezies (l_{1-3} , m_{1-3} , s_{1-4}), die dieselbe Polarität wie die (+) Stränge der Genom-RNS besitzen und während der frühen Phase der Infektion am 5'-Terminus durch den "cap" modifiziert sind (Shatkin et al., 1983). Als "cap" bezeichnet man ein 7-Methylguanosin, das über eine 5'-Phosphatbindung an das nachfolgende Nukleosid geknüpft ist, wobei das endständige Nukleosid methyliert ist. Insgesamt tragen fünf Enzymaktivitäten zur cap-Modifizierung der naszierenden mRNS-Spezies bei:

- (1) $pppG + pppC \xrightarrow{\text{RNS-Polymerase}} pppGpC + PPi$
- (2) $pppGpC \xrightarrow[\text{Phosphohydrolase}]{\text{Nukleotid -}} ppGpC + Pi$
- (3) $ppGpC + ppG \xrightarrow{\text{Guanylyltransferase}} GpppGpC + PPi$
- (4) $GpppGpC + SAM \xrightarrow{\text{Methyltransferase 1}} m^7GpppGpC + SAH$
- (5) $m^7GpppGpC + SAM \xrightarrow{\text{Methyltransferase 2}} m^7GpppG^m pC + SAH$

Nur die Guanylyltransferaseaktivität wurde bisher als Funktion des Spikeproteins $\lambda 2$ identifiziert (Shatkin et al., 1983). Eine eindeutige Zuordnung der Polymeraseaktivität zu $\lambda 1$ oder $\lambda 3$ steht noch aus (Morgan und Kingsbury, 1980; Drayna und Fields, 1982). Welche der Kernproteine für alle weiteren Enzymaktivitäten verantwortlich sind, ist nicht bekannt. Weitere Transkriptionsprodukte der subviralen Partikel stellen die Oligonukleotide dar, deren Anteil an der Gesamt-RNS im Virion etwa 25 % beträgt (Joklik, 1981). Den Hauptanteil bilden die 5'-G-terminierten Oligonukleotide mit einer Kettenlänge von 2-4 Nukleotiden. Sie stellen sehr wahrscheinlich Abbruchprodukte der Transkriptaseaktivität dar, da ein kleiner Teil dieser Nukleotide der Transkriptase als "primer" dienen kann (Shatkin et al., 1983). Die zweite Gruppe bilden die Oligoadenylate, die erst während der späten Phase der Infektion auftreten und vermutlich bei der Reifung (processing) der viralen Strukturproteine eine wesentliche Rolle spielen. Ein ebenfalls während der späten Phase auftretendes, niedermolekulares Protein (wahrscheinlich σbNS) scheint für diese Adeninnukleotidierung verantwortlich zu sein, da durch Inhibition dieser Modifizierung durch Drogen (Nikotinamidanaloga) dieses Protein nicht auftritt, und damit die Entstehung unreifer Viruspartikel gefördert wird (Mora und Carter, 1983).

1.5 Der replikative Zyklus des Serotyps 3 (Stamm Dearing)

Die natürliche Aufnahme von infektiösen Viruspartikeln erfolgt über den Respirations- bzw. Gastrointestinaltrakt. Unter dem Einfluß der pankreatischen Enzyme findet eine partielle Verdauung des äußeren Kapsids zu subviralen Partikeln statt, die noch das δ -Protein tragen. Das virale Hämagglutinin $\sigma 1a$ adsorbiert über glykosidische Bindung an β -adrenerge Rezeptoren von Zellen, die diese Rezeptoren an ihrer Oberfläche exprimieren (Immun-, Nichtimmunlymphozyten, Neuronen) und induziert somit die Viruspenetration der Zelle. Das virale Hämagglutinin bestimmt daher die Zell- und Gewebsspe-

zifität im Wirt.

Bei der Infektion von Versuchstieren via intraperitonealer oder intrazerebraler Route oder auch bei der Infektion von Zellen adsorbieren komplette Viruspartikel über $\sigma 1a$ an Rezeptoren der Zelloberflächen. Durch Phagozytose gelangen die Virionen in die zellulären Vakuolen, die später mit den Lysosomen fusionieren. Durch den proteolytischen Inhalt der Lysosomen entstehen ebenfalls subvirale Partikel, die beim Entleeren der Vesikel ins Zytoplasma ihre Transkriptaseaktivität entfalten.

Bei der Entstehung von subviralen Partikeln werden die Proteine $\sigma 1$, $\sigma 3$, ein Teil von $\mu 1$, sowie die 5'-G-terminierten Oligonukleotide freigesetzt. Eine kleine Population dieser Oligonukleotide dient der viralen Transkriptase als "primer" bei der mRNS-Synthese. Zu Beginn des Zyklus werden durch den 5'-cap modifizierte mRNS-Spezies gebildet. Eukaryotische mRNS-Spezies tragen den "cap" am 5'-Terminus, da dieser die Effizienz bei der Translation erhöht. Der "capping"-Prozeß der viralen mRNS stellt daher einen entscheidenden Faktor bei der Regulation der Translation in infizierten Zellen dar. Die virale mRNS kann mit der zellulären mRNS um die Bindung an Ribosomen konkurrieren und den zellulären Translationsapparat zur Produktion viraler Proteine nützen. Die mRNS-Spezies der frühen Phase der Infektion sind l_1 , m_3 , s_3 und s_4 und kodieren für die Proteine $\lambda 3$, μNS , σNS und $\sigma 3$.

Im weiteren Verlauf der Infektion werden alle primären mRNS-Spezies synthetisiert, wobei ihre Größe invers zur Anzahl der gebildeten mRNS-Moleküle ist. Es entstehen unreife Partikel, die das innere Kapsid mit den Proteinen $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\sigma 2$ und $\mu 1C$, sowie ein komplettes Set einzelsträngiger (+) Transkripte aufweisen.

Während der späten Phase synthetisierte mRNS-Spezies tragen den "cap" nicht mehr, aber der zelluläre Translationsapparat produziert weiterhin fast ausschließlich virale Proteine, wobei die zelluläre DNS-/RNS-Synthese stark inhibiert ist (Skup et al., 1981). Nicht bekannt ist bisher, auf welche Weise der zelluläre Translationsapparat auf Virusproduktion umgestellt wird, noch, wie die Information für ein kom-

plettes Set von zehn Genen gespeichert ist. In den naszenten Partikeln erfolgt die Replikation der (+) Transkripte zur dsRNS. So entstehen neue subvirale Partikel, die als Hauptfaktoren zur viralen Multiplikation beitragen.

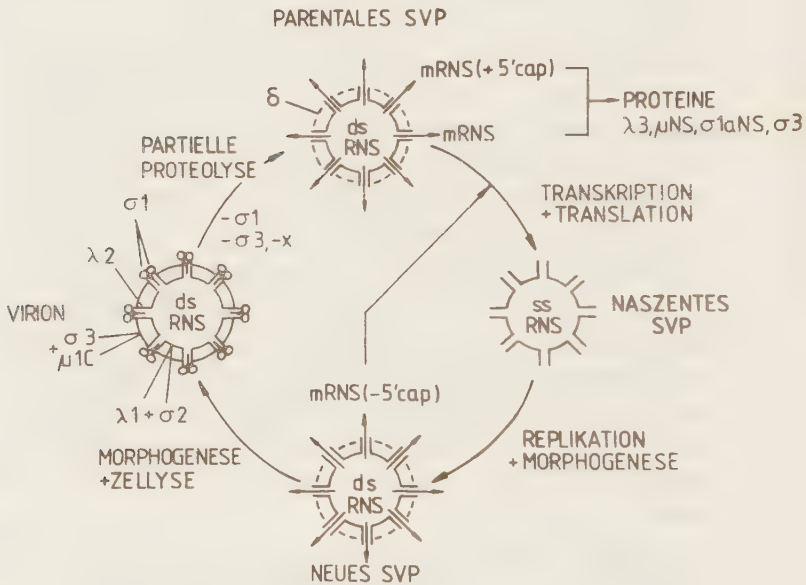


Abb. 2: Die Multiplikation des Serotyps 3 (Stamm Dearing)

Durch teilweise Proteolyse des äußeren Kapsids entstehen aktivierte Viruspartikel oder subvirale Partikel (SVPs), die den replikativen Zyklus des Virus einleiten (nähere Erläuterungen dazu siehe Text).

Im Gegensatz zur semikonservativen Replikation der eukaryotischen DNS (je ein Elternstrang der DNS dient als Matrize der neuen DNS) erfolgt die Replikation der Reovirus-dsRNS voll konservativ. Die parentale dsRNS bleibt stets kernassoziiert und nur einzelsträngige Transkripte verlassen den Kern. Diese einzelsträngigen Transkripte dienen der Proteinsynthese und bilden die Matrize für die neue dsRNS. Das Endstadium der Morphogenese wird durch Addition des Proteins $\sigma 3$ eingeleitet, das eine Inhibition der Transkriptaseaktivität auslöst (Astell et al., 1972). Der Zyklus endet lytisch mit dem Zelltod und der Freisetzung kompletter Viruspartikel.

1.6 Aufgabenstellung

Die Diagnose einer Virusmyokarditis gilt nur dann als gesichert, wenn ein positiver Virusnachweis vorliegt. Es sollte daher in der neugeborenen Maus durch Infektion mit Reovirus, Serotyp 3 (Dearing), ein Modell der Virusmyokarditis entwickelt werden und der Virusnachweis reproduzierbar durch Anwendung histologischer, elektronenmikroskopischer und molekularer Hybridisierungstechniken erbracht werden. Neben den makroskopischen und mikroskopischen Gewebsveränderungen als Folge der Infektion sollte vor allem die Anwesenheit viraler Nukleinsäuresequenzen im infizierten Gewebe zum frühestmöglichen Zeitpunkt der Infektion mit Hilfe der neu etablierten Hybridisierungsmethode bestätigt werden. Die Sensitivität dieser Technik sollte darüber entscheiden, ob sie klinisch als diagnostisches Mittel bei der Suche nach Picornaviridae einsetzbar sei.

Ein weiteres Anliegen war die Erprobung von Interferon als Therapeutikum bei symptomatischer Myokarditis. Es ist bekannt, daß Interferon durch Errichten eines "antiviralen Status" Zellen oder Tiere vor Virusbefall schützt, wenn es vor Infektion appliziert wird (Stewart, 1979). Die prophylaktische Anwendung von Interferon ist jedoch klinisch nicht durchführbar.

2 MATERIALIEN

- 2.1 Tiere
NMRI-Mäuse, männlich und weiblich, 12-36 Stunden alt,
Fa. IWW, Gelting.
- 2.2 Reovirus Typ 3 Dearing, 5 mg/ml, und (5,6- ³ H-UTP)mRNS
des Typs 3 mit einer spezifischen Aktivität von 40-60 Ci/-
mMol waren ein Geschenk von Dr. M. van der Walt, Universi-
tät in Potchefstroom, Südafrika.
- 2.3 Maus-(α + β)-Interferon, TNE-Puffer, pH 7,2, 200 ku, wurden
von Paesel GmbH & Co., Frankfurt, gekauft.
- 2.4 Chemikalien und andere Materialien

Amersham-Buchler, Braunschweig

¹⁴ C-markierte Proteinmischung (Myosin, Phosphorylase b,
Serumalbumin, Ovalbumin, Carboanhydrase, Lactoglobulin,
Lysozym, 10-50 μ Ci/mg Protein)

Bethesda Research Laboratories; Life Technologies Inc., Maryland, USA

Kaninchen-Retikulozyten-Translationskit (Nuklease-behan-
delt), Harnstoff

Biochrom KG, Berlin

Phenolrot, CMRL-1415 Nährmedium für Herzmuskelzellen,
Collagenase "Worthington" CLS II

BioRad, München

Acrylamid, Ammoniumperoxodisulfat, Coomassie Brilliantblau
R-250, Glycin, N,N'-Methyl-bisacrylamid, Nitrozellulosemem-
bran (0,45 µm), Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris),
Silberfärbungskit

Böhringer-Mannheim GmbH, Mannheim

Transfer-RNS (Kalbsleber)

Dynatech Deutschland GmbH, Denkendorf

Reovirus-Antiserum, gruppenspezifisch (Meerschweinchen)
Reovirus-Antiserum, Typ 3 - spezifisch (Ziege)

FMC Corporation, Rockland, Maine, USA

SEAKEM ME Agarose

Gibco Europe GmbH, Karlsruhe

Fötale Kälberserum und Pferdeserum, hitzeinaktiviert

Kodak, Rochester, USA

Röntgenfilm X-Omat AR 5

Merck AG, Darmstadt

Ameisensäure, Chloroform, Dimethylsulfoxid, EDTA, Essigsäure, Ethanol, Isoamylalkohol, β -Mercaptoethanol, Methanol, Phenol, Natriumazetat, Natriumchlorid, Natriumzitat, D-Glukose

Miles GmbH, Frankfurt

Ribosomale RNS (E. Coli)

New England Nuclear, Boston, USA

L-³⁵S-Methionin (etwa 1000 Ci/mMol)

Nunc GmbH, Wiesbaden

Zellkulturflaschen

Serva, Heidelberg

SDS, Trypsin 1:250 (Rinderpankreas)

Sigma Chemie GmbH, München

Nonidet P-40, Polyvinylsulfat, RNase-XA, Rinderserumalbumin, Zitronensäure-Monohydrat, β -Alanin

Whatman Ltd., Maidstone, Kentucky, USA

3 MM Filterpapier GF/C

3. METHODEN

3.1 Isolierung der dsRNS aus gereinigtem Virus (modifiziert nach McCrae und Joklik, 1978)

Die Virussuspension (ursprünglich 5 mg/ml) wurde in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, auf 1 mg/ml verdünnt und durch Zugabe von SDS auf 1 % eingestellt. Die Deproteinierung wurde durch drei kombinierte Extraktionen mit Phenolmix (puffergesättigtes Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol, 50:50:1, V/V/V) und Ether vorgenommen. Der letzte wässrige Extrakt wurde auf 0,15 M NaCl eingestellt und die RNS mit 2 Volumina absolutem Ethanol über Nacht gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation gesammelt, mit 90 % Ethanol gewaschen, getrocknet, in 0,01 M STE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10mM NaCl, 1 mM EDTA) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Der dsRNS-Gehalt wurde durch die Beziehung $-1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 50 \text{ } \mu\text{g dsRNS/ml}$ - bestimmt (Smith et al., 1969).

3.2 Infektion der Mäuse

Mehrere Würfe neugeborener Mäuse wurden in Kontroll- und Versuchsgruppen eingeteilt. Die Versuchsgruppen wurden 12-36 Stunden nach Geburt mit je 10 μg / 4 μl Reovirus Typ Dearing infiziert.

3.3 Histologische Untersuchungen

Kryostat-Gewebsschnitte (6 μm dick) aus Kontroll- und infizierten Herzen wurden angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (Kryostat 881, "T", Fa. Dittes, Heidelberg).

3.4 Vorbereitung der Herzen für die elektronenmikroskopische Untersuchung

Herzstücke aus infizierten Mäusen wurden 3-11 Tage nach Infektion 2 Stunden lang in kaltem, gepuffertem Glutardialdehyd (Sörensenpuffer, pH 7,4) fixiert. Nach Auswaschen des Glutardialdehyds mit 0,2 M Saccharose, 1 % Thimerosal, wurden die fixierten Herzstücke bis zur Aufarbeitung in der Saccharoselösung aufbewahrt. Die Untersuchungen führte freundlicherweise Prof. Dr. G. Hübner vom Institut für Pathologie durch.

3.5 Isolierung der Gesamt-RNS aus Herzmuskelgewebe von Kontroll- und infizierten Mäusen (modifiziert nach Shields und Blobel, 1977)

3-11 Tage nach der Infektion wurden infizierte Mäuse zusammen mit gleichaltrigen Kontrolltieren durch Genickquetschung getötet, die Herzen sofort entfernt und in eiskalter 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen. Sie wurden anschließend homogenisiert in 35 Volumina pro Gramm Herzgewicht pH 8,3 Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 5 mM EDTA, 1 % SDS und 11 mg pro Gramm Herzgewicht Proteinase K) und nach zehnmütigem Absitzen bei Raumtemperatur (RT) je dreimal abwechselnd mit Phenolmix (siehe 3.1) und Ether extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 1,5 M NaCl auf 0,15 M eingestellt, die RNS mit kaltem, absolutem Ethanol über Nacht präzipitiert, mit 90 % Ethanol gewaschen und bis zur Hybridisierung in 0,01 M STE-Puffer (siehe 3.1) bei -20°C gelagert. Der RNS-Gehalt wurde durch die Beziehung $-1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 40 \text{ } \mu\text{g RNS}$ bestimmt.

3.6 Hybridisierung der Gesamt-RNS aus infiziertem und nicht-infiziertem Herzmuskel gegen ^3H -markierte Reovirus-mRNS (modifiziert nach Watanabe et al., 1967)

Die Reaktionsmischungen (insgesamt 160 μl) enthielten je 1,1 μg der Tritium-markierten Reovirus-mRNS (etwa 6000 cpm), 0-119 μg Gesamt-RNS aus Kontroll- und infizierten Herzen in Hybridisierungspuffer 0,01 M STE (siehe 3.1) und 0,05 % Polyvinylsulfat. Nach fünfminütigem Kochen der Proben im Wasserbad zur Strangtrennung wurde eine halbe Stunde bei 73 ° C in Gegenwart von 0,3 M NaCl inkubiert zur Reassoziaton der dsRNS durch Austausch des (+)-Stranges gegen die radioaktiv markierte mRNS. Die einzelsträngige RNS wurde durch RNase XA (0,2 mg/ml) in 0,3 M STE-Puffer (0,3 M Tris-HCL, pH 7,4, 0,3 M NaCl, 30 mM EDTA) innerhalb 15 Minuten verdaut und die resistenten Hybride durch 10 % TCA mit Rinderserumalbumin (1mg/ml) als Trägermaterial gefällt. Das Präzipitat wurde auf Nitrozellulosefiltern (0,45 μm) gesammelt, mit 5 % TCA gewaschen, getrocknet und in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (auf Toluolbasis) mit 33 % Ausbeute gezählt.

3.7 Gabe von Interferon

Sechs Tage nach Infektion erhielten zweimal 4 Würfe von infizierten Mäusen mit symptomatischer Viruserkrankung an drei aufeinanderfolgenden Tagen je $10^4 / 10^3 / 10^2$ und 10 Einheiten pro 10 μl pro Tier Maus-($\alpha + \beta$)-Interferon. 9-12 Tage nach Infektion wurden die Interferon-behandelten Tiere getötet und ihre Herzen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht.

3.8 Translation der Gesamt-RNS in Retikulozytenlysat (Mans und Novelli, 1961)

Pro Probe wurde ein Mix von 20 μ l aus Reaktionsmischung (3 μ l), der alle Aminosäuren bis auf Methionin enthielt, 2 M Kaliumazetat, (0,7 μ l), L-³⁵S-Methionin, etwa 50 μ Ci (5 μ l), Retikulozytenlysat (10 μ l) und 10 - x μ l steriles Wasser angesetzt und mit 0 - 10 μ l = x der Gesamt-RNS versetzt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 30°C im Wasserbad wurde je 1 μ l der Translationsmischung auf Whatman 3 MM Papier aufgetragen, für 10 Minuten in kalte, 10 %ige TCA getaucht, anschließend für 5 Minuten in 5 %ige TCA und zur Hydrolyse der beladenen Transfer-RNS-Spezies in 5 %iger TCA bei $90 \pm 2^\circ\text{C}$ 10 Minuten lang gekocht. Für weitere 1 - 2 Stunden wurde bei 4°C zur Zerstörung des Hämins in 10 % TCA/Ameisensäure/Wasserstoffperoxid (2:1:1, V/V/V) entfärbt, nacheinander in Ethanol/Ether (1:1, V/V) und Ether überführt, getrocknet und in 10 ml Szintillationsflüssigkeit auf Toluolbasis gezählt (Zählausbeute 33 %).

3.9 Trennung der Translationsprodukte auf SDS-Polyacrylamidgelen

Die Präparation von 10 % oder 12,5 %igen SDA-PAA-Gelen erfolgte nach dem in Tabelle 1 a und 1 b angegebenen Schema.

Trenngel

Lösungen	Ausgangskonz.	Endkonz. 20 ml	Endkonz. 20 ml
Acrylamid	30 %	10 %	12,5 %
Bis	0,8 %	0,05 % 6,7 ml	0,07 % 8,3 ml
Tris-HCl, pH 8,9	0,3 M	37,5 mM 2,5 ml	37,5 mM 2,5 ml
Wasser	-	- 10,5 ml	- 8,9 ml
SDS	10 %	0,1 % 0,2 ml	0,1 % 0,2 ml
APS	10 %	0,05 % 0,1 ml	0,05 % 0,1 ml
TEMED	konz.	0,05 % 10 µl	0,05 % 10 µl

Tabelle 1 a: Präparation eines 10 % bzw. 12,5 %igen Trenngels

Sammegel

Lösungen	Ausgangskonz.	Endkonz. 5 ml
Acrylamid	30 %	3 %
Bis	0,8 %	0,004 % 0,5 ml
Tris-PO ₄ , pH 6,7	50 mM	6,3 mM 0,6 ml
Wasser	-	- 3,8 ml
SDS	10 %	0,1 % 50 µl
APS	10 %	0,05 % 25 µl
TEMED	konz.	0,05 % 2,5 µl

Tabelle 1 b: Präparation eines 3 %igen Sammelgels

Je 1 µl der Translationsmischung, der die ³⁵S-markierten Proteine enthält, wurde mit Probenpuffer (60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 5 % β-Mercaptoethanol, 0,001 % Bromphenolblau) versetzt, 5 Minuten gekocht und auf das Gel aufgetragen. Die Elek-

trophorese lief bei 220 V etwa 4-6 Stunden.

3.10 Nachweis der Proteine

3.10.1 Färbung mit Coomassie Brilliantblau R-250

Nach beendetem Lauf wurde das Gel 30 Minuten in 0,2 % Coomassieblau/50 % Methanol/7 % Eissessig angefärbt und über Nacht in 5 % Methanol/7 % Eissessig entfärbt.

3.10.2 Silberfärbung (Merril, 1981; modifiziert im Kit von BioRad)

Alternativ wurden die Gele nach dem Lauf in 50 % Methanol/-10 % Essigsäure über Nacht fixiert und überschüssiges SDS durch dreimaliges Waschen je 10 Minuten in je 200 ml Ethanol/5 % Essigsäure entfernt. Eingeleitet wurde die Färbung durch 5-minütige Behandlung der Gele mit 200 ml 3,4 mM Kaliumdichromat/0,0032 N Salpetersäure und mehrmaligem kurzem Wässern zur Reduktion des Hintergrundes. Sie wurde durchgeführt in 200 ml 12 mM Silbernitrat für 30 Minuten. Nach kurzem Wässern wurde in 0,28 M Natriumcarbonat/0,5 ml Formaldehyd (37 %) entwickelt bis zur gewünschten Intensität der Banden. Die Entwicklung wurde gestoppt in 100 ml 1 % Essigsäure nach 15 Minuten und die Gele bis zum Trocknen in Wasser aufbewahrt.

3.10.3 Fluorographie und Autoradiographie

Gele mit ^{35}S -markierten Proteinen wurden nach Färbung in DMSO/PPO fluorographiert, getrocknet und autoradiographiert.

3.11 Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran (Western-Blotting, Burnette, 1981)

Der elektrophoretische Transfer der Proteine auf Nitrozellulose erfolgte im Blotpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) über Nacht bei 30 V/80-100 mA in einer Transblot-Zelle von BioRad (Towbin et al., 1979). Anschließend wurde die Membran 2 Stunden lang bei RT in TS (Tris-HCl, pH 7,4, 0,9 % NaCl) und 3 % BSA äquilibriert und bei RT unter Schütteln mit einer frischen Lösung TS + 3 % BSA + Reovirusantiserum 12-24 Stunden inkubiert (Konz. des Antiserums : 2 ml auf 50 ml Lösung).

Der überschüssige Antikörper wurde durch fünfmaliges Waschen mit je 100 ml TS, TS + 0,05 % Nonidet P-40 (2x) und TS (2x) entfernt und die IgG belegten Proteine mit ^{125}J -markiertem Protein A versetzt (0,5 μCi in 20 ml TS + 3 % BSA). Nach 4 Stunden Reaktionszeit bei RT wurde wie oben zur Entfernung des überschüssigen markierten Proteins A gründlich gewaschen, zwischen Bleiplatten auf Filterpapier getrocknet und auf auf Kodak X-Omat AR 5-Röntgenfilm 1 Woche exponiert.

3.12 Agarose-Harnstoff-Gele zur Auftrennung der RNS-Segmente

108 g Harnstoff wurden in 60 ml Bidest bei 60°C gelöst. 6 g Agarose wurden aufgekocht in 126 ml Bidest, 22,4 ml 0,25 M Zitronensäure und 7,4 ml 0,25 M Zitronensäure/0,5 M β -Alanin. Beide Lösungen wurden vereinigt und mit 1,5 ml 20 % SDS versetzt. Die Endkonzentration im Gel waren : 2 % Agarose, 6 M Harnstoff, 0,1 % SDS, 25 mM Zitronensäure und 12,5 mM β -Alanin. Die Gel-Lösung wurde in eine vorbereitete Horizontal-Elektrophorese-Kammer gegossen und bei 4°C erstarren lassen.

Pro Probe wurden Cocktails aus 3,3 μl RNS (3-5 μg), 3,7 μl Saccharose-Färbelösung (50 % Saccharose, 3 mg/ml Xylencyanol, 3 mg/ml

Bromphenolblau, 1 mM EDTA) und 17,3 μ l Lösung Y (1 g Harnstoff in 0,7 ml Bidest, erhitzt auf 75 ° C) gemischt, 5 Minuten auf 75 ° C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von Lösung X (0,25 M Zitronensäure und 0,25 M Zitronensäure/0,5 M β -Alanin im Verhältnis 4 : 1) wurden die Proben in die Geltaschen gefüllt, mit Elektrophoresepuffer (0,25 mM Zitronensäure, 50 mM β -Alanin, 0,1 % SDS) bedeckt und 4 - 6 Stunden bei 170 V, 4°C, elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Nachweis der RNS wurde das Gel über Nacht in Boratpuffer (50 mM Borsäure, 5 mM Borax, 10 mM Natriumsulfat, pH 10) mit Ethidiumbromid gefärbt (0,5 μ g Ethidiumbromid pro ml Puffer), mit UV-Licht von unten bestrahlt und mit einer Sofortbildkamera (Polaroid, CU 5) photographiert.

3.13 Versuche mit Herzmuskelzellkulturen

3.13.1 Präparation neonataler Mausherzmuskelzellen (modifiziert nach Harary et al., 1974)

Unter sterilen Bedingungen wurden 1-2 Tage alte NMRI-Mäuse durch Genickquetschung getötet, die noch schlagenden Herzen entnommen und in eiskalter PBSAG-Lösung gewaschen. Nach der mechanischen Zerkleinerung mit einer Schere (Kantenlänge etwa 1 mm) wurden die Gewebestücke durch wiederholte "Trypsinierungen" (Behandlung mit Trypsin 0,12 % und Collagenase 0,03 % in PBSAG) bei 37 ° C in Einzelzellen zerlegt bei einer Einwirkdauer von jeweils 5-10 Minuten. Der Zusatz von je 2 ml eiskaltem Wachstumsmedium (CRML 1415, 10 % fötales Kälberserum, 10 % Pferdeserum, 50 μ g/ml Antibiotikum) stoppte die Trypsinaktivität in den gesammelten Zellsuspensionen, die anschließend bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert wurden. Nach Abgießen des Überstandes wurde mit neuem Wachstumsmedium resuspendiert, in Nunc-Zellkulturflaschen eingesät (Einsaatdichte 2×10^5 Zellen /cm²) und für zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank (Heinicke-Napco-Brutschrank) inkubiert. Während die-

ser Zeit wurden überwiegend die fibroblastoiden Zellen, die etwa 30 - 40 % der Herzzellen darstellen, adhären, während die myoblastoiden Zellen noch abgerundet in Suspension bleiben. Diese Separationsmethode wird als DAT = "differential attachment technique" bezeichnet (Blondel et al., 1971; Kasten, 1973). Mit Hilfe eines Hämozytometers wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop die Gesamt-Zellzahl pro Volumeneinheit bestimmt, mit zusätzlichem Medium auf die gewünschte Zellsuspension eingestellt und auf 25 cm² Nunc-Zellkulturflaschen verteilt (Einsaatdichte 25000 Zellen pro cm²). Nach 24 Stunden wurde das Wachstumsmedium durch synthetisches Medium (CMRL 1415, 4,4 µM Insulin, 0,37 µM BSA, 0,1 µM Dexamethason, 11,1 nM Transferrin, 50 µg/ml Antibiotikum) ersetzt, um noch vorhandene Debris sowie tote Zellen abzutrennen und das Wachstum mitgefällter Fibroblasten zu unterdrücken. Bereits nach sechs Stunden zeigten die Myoblasten auch bei noch schwach ausgeprägter Adhärenz die ersten spontanen Kontraktionen. In 4-Tagesabständen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach etwa drei Wochen waren die Zellen konfluent. Die Myoblasten konnten in Kultur bis zu zwei Monaten lebensfähig gehalten werden.

3.13.2 Infektion der Zellen mit Reovirus Typ 3 (Dearing)

Zellkulturflaschen mit Fibroblasten (Einsaat circa 25000 Zellen pro cm²) und Duplikate von Zellkulturflaschen mit Myoblasten (Einsaat 25000 Zellen pro cm²) wurden mit je 4 µl einer Virussuspension infiziert, wobei die Virusstammlösung (5 mg/ml) je 1:2, 1:20, 1:200 und 1:2000 mit Medium verdünnt war.

In diesem Versuch wurde das Verhalten von 3 und 10 Tage alten Zellkulturen mit gleichaltrigen nicht-infizierten Zellkulturen derselben Einsaat verglichen und der Verlauf der Infektion mit Hilfe eines inversen Phasenkontrastmikroskops (Leitz-Diavert) photographiert.

4. ERGEBNISSE

4.1 Vorversuche

Bevor das Virus zur Infektion von Tieren eingesetzt werden konnte, mußten erst optimale Bedingungen für die Hybridisierung geschaffen und eine Kreuzreaktion der ^3H -markierten Reovirus-mRNS mit Herzmuskelhomogenat ausgeschlossen werden.

Beim Versuch der Hybridisierung von kompletten Viruspartikeln gegen die ^3H -markierte mRNS zeigte sich, daß die Deproteinierung der Genom-RNS essentiell für eine effiziente Hybridbildung war. Dies wurde durch Proteinase-K-Behandlung und Phenolextraktion erreicht.

Aus je 500 μg Virus wurden im Schnitt etwa 20 - 25 μg RNS isoliert (nach Bellamy, 1967, beträgt der Massenanteil der RNS im Virion etwa 14 %). Eine Erhöhung der viralen dsRNS-Konzentration im Reaktionsansatz gegenüber einem konstanten Überschuß an ^3H -markierter mRNS bewirkte eine Zunahme an radioaktiv-markierten, RNase-resistenten Hybriden, wobei durchschnittlich 10 - 20 % der eingesetzten dsRNS-Menge wiedergefunden wurde.

1,1 μg ^3H -markierter Reovirus-mRNS mit 5000 - 6000 cpm waren ausreichend für die Bildung von Hybriden, die sich noch deutlich vom radioaktiven Hintergrund abhoben und daher als Fixgröße in allen folgenden Hybridisierungen eingesetzt wurden.

Im Homogenat von Ratten- und Mausherzen befanden sich offensichtlich keine komplementären Sequenzen zur viralen mRNS, da trotz Steigerung der Konzentration an Homogenat kein Anstieg der Radioaktivität und damit keine Hybridbildung erfolgte.

4.2 Tierversuche

4.2.1 Virulenz des Serotyps 3 (Stamm Dearing)

Zur Erprobung der Virulenz wurden drei Würfe (25 Tiere) 12 - 36 Stunden alter Mäuse mit 4 μ l (10 μ g) der 1:2 verdünnten Virusstammlösung (5 mg/ml) intraperitoneal infiziert. In ihrer Entwicklung wurden sie mit gleichaltrigen Kontrollmäusen verglichen (2 Würfe = 16 Tiere), wobei beide Gruppen am 7. Tag nach Infektion bzw. 8 Tage nach Geburt getötet und die Gesamt-RNS ihrer Herzen auf die Anwesenheit viraler Sequenzen durch Hybridisierung gegen ³H-markierte Reovirus-mRNS getestet wurde.

Die Ausfallquote bis zum 8. Tag nach Geburt lag bei den Kontrollmäusen 1/16 und bei den infizierten Tieren 6/25.

Bei den infizierten Tieren war gegenüber den Kontrolltieren äußerlich nur ein Minderwuchs des Haarkleides sowie eine verminderte Motilität zu beobachten. Bei der Eröffnung des Thoraxraumes am 7. Tag nach der Infektion zeigten die Tiere jedoch Aszites und z.T. übergroße Herzen, deren Oberfläche mit gelblich-weißen Nekrosen übersät war, siehe Abbildung 3.

Herzgewichte und deren Gesamt-RNS-Gehalt der Kontrollmäuse lagen bei 26,7 mg und 286 μ g pro Tier und die der infizierten Mäuse bei 37,9 mg und 262 μ g pro Tier (siehe Tabelle 3).

Die Hybridisierung von 1,1 μ g Reovirus-mRNS gegen 0 - 94 μ g Gesamt-RNS aus den Herzen von Kontroll- und infizierten Mäusen ergab für die Kontrolltiere nur Schwankungen um den Nullwert (336 cpm 0 μ g - 300 cpm 94 μ g) und für die infizierten Tiere einen Anstieg von + 195 cpm (238 cpm 0 μ g - 433 cpm 94 μ g). Dies entspricht etwa 30 ng gebundener radioaktiv-markierter mRNS.

Um die Reproduzierbarkeit dieses ersten Versuchs zu garantieren, wurde er noch viermal wiederholt. Für $n = 5 \pm$ Standardabweichung ergab sich bei den Kontrolltieren ein durchschnittliches Herzgewicht von 26 ± 3 mg und ein Gesamt-RNS-Gehalt von 305 ± 77 μ g pro Tier und bei den infizierten Tieren ein Herzgewicht von 30 ± 5 mg

und ein Gesamt-RNS-Gehalt von $363 \pm 187 \mu\text{g}$ (siehe Tabelle 3). Bei der Hybridisierung der Gesamt-RNS aus Kontrollherzen gegen die virale mRNS traten nicht nur Schwankungen um den Nullwert, sondern überwiegend leicht negative Werte bei der Differenzbildung $\text{cpm } 0 \mu\text{g} - \text{cpm } x \mu\text{g}$ für $x = 0 - \text{max. } 119 \mu\text{g}$ Gesamt-RNS auf, wogegen die Gesamt-RNS aus infizierten Herzen stets eine Zunahme an präzipitierter Radioaktivität erbrachte. Für $n = 5$ ergab die Gesamt-RNS der Kontrollen eine Differenz von $-45 \pm 46 \text{ cpm}$ und die Gesamt-RNS der infizierten Herzen $+131 \pm 53 \text{ cpm}$.

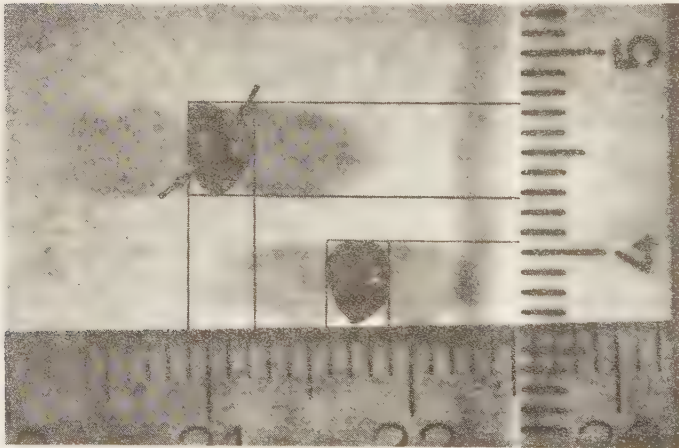


Abb. 3: Vergleich eines infizierten Herzens 7 Tage nach Infektion mit einem gleichaltrigen Kontrollherzen (3,7-fach)
Die Nekrosen im infizierten Herzen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.2.2 Der zeitliche Verlauf der Infektion

Vor allem waren nun die Fragen zu klären, ab welchem Zeitpunkt der Infektion und wie lange der Nachweis viraler Sequenzen im infizierten Myokard möglich ist, da Reovirus durch Mutationen des S 4 - Genoms auch persistierende Infektionen erzeugen kann (Ahmed und Fields, 1982; Fields, 1985).

Dazu wurden in fünf weiteren Experimenten insgesamt 36 Würfe neonataler Mäuse in Kontroll- und Versuchsgruppen eingeteilt und letztere wie in 4.2.1 beschrieben, infiziert.

Ab dem 3. Tag bis zum 7. Tag der Infektion wurden in Zweitagesabständen, ab dem 7. Tag täglich, je Kontroll- und Versuchsgruppen getötet, die Herzen entnommen und histologisch, elektronenmikroskopisch und durch Hybridisierung auf Virusanwesenheit überprüft.

4.2.2.1 Symptome und makroskopische Veränderungen

Die Infektion neugeborener NMRI-Mäuse mit Reovirus Typ 3 (Dearing) verursachte eine fatale Myokarditis, in deren Verlauf die Tiere ab dem 9. bis zum 12. Tag nach Infektion starben. Ab dem 7. Tag der Infektion traten Symptome wie verzögertes Wachstum, gestörter Haarwuchs, Aszites und gelegentlich Anzeichen einer Enzephalitis wie Tremor und Hinterpfotenlähmung deutlich in Erscheinung.

Während die Sterblichkeitsrate bei den infizierten Tieren zu Beginn der Infektion bei 1-2 Mäusen pro Wurf lag, steigerte sie sich ab dem 8. Tag, so daß nur wenige Tiere bis zum 12. Tag der Infektion überlebten. Entscheidend für den Verlauf der Infektion war auch der Ernährungszustand eines Wurfes. Wohlgenährte Tiere überlebten etwas länger, während eher unterernährte Tiere bereits frühzeitig Symptome zeigten und ab dem 8. Tag der Infektion starben. Bei der Autopsie waren ab dem 5. Tag der Infektion nekrotische Veränderungen des Myokards sichtbar, deren Häufigkeit und Größe mit Infek-

tionsdauer zunahm. Ab dem 4. Tag waren zudem starke Atrophie von Thymus und Milz ausgeprägt (siehe Tabelle 2).

4.2.2.2 Mikroskopische Veränderungen

HE-Färbung von Kryostatschnitten ($6\text{ }\mu\text{m}$) aus infiziertem Mausmyokard demonstrierten entzündliche Infiltrate und Nekrosen ab dem 7. Tag der Infektion, wobei das Ausmaß der Zerstörung von kontraktilen Gewebe ab dem 9. Tag der Infektion ein kritisches Stadium erreichte (siehe Abbildungen 4 und 5, S. 30).

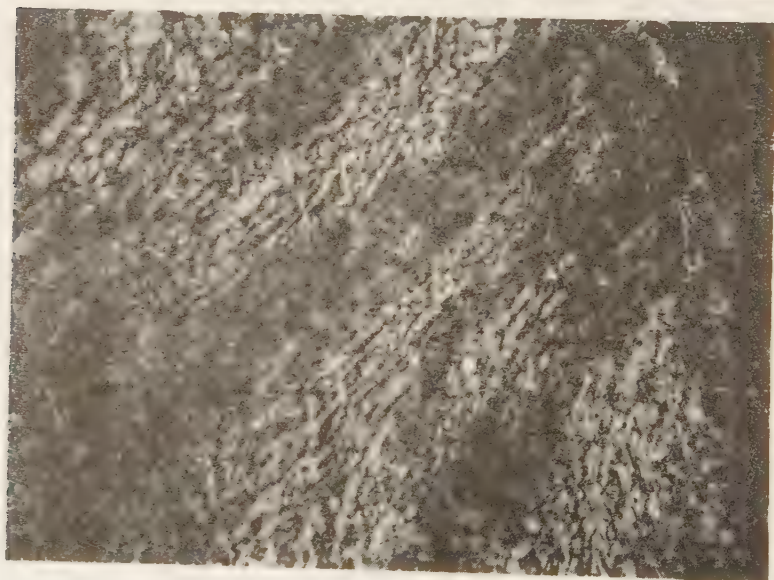
Abb. 4 und 5 (Legende zu Seite 30, 160-fach)

Kryostat-Schnitte aus infizierten Herzen 7 Tage nach Infektion (Bild oben) und 9 Tage nach Infektion (Bild unten).

Während Abb. 4 noch entzündliche Infiltrate und wenige Nekrosegebiete aufweist, zeigt Abb. 5 bereits stark ausgeprägte Nekrosebezirke.

Alter (Tage)	Tage nach Infektion	Herzgewicht (mg)	Milzgewicht (mg)	Thymusgewicht (mg)
3	-	12,4	5,4	10,4
3	2	10,4	3,4	7,1
3	2	11,8	4,0	4,5
4	-	12,1	9,2	8,5
4	3	14,9	7,4	11,5
4	3	13,3	7,7	9,2
5	-	18,2	15,6	17,5
5	4	13,5	8,6	6,6
5	4	17,0	9,2	6,9
6	-	33,5	17,8	23,0
6	5	10,4	1,7	4,3
6	5	8,4	0,9	1,0
7	-	31,5	17,6	35,6
7	6	11,6	6,1	4,5
7	6	12,9	4,1	7,1
8	-	38,8	29,3	41,7
8	7	32,2	37,5	25,8
8	7	32,1	27,3	34,5
8	7	34,3	26,8	30,4
10	-	42,6	51,9	56,0
10	9	27,2	8,9	11,4
11	-	50,7	53,5	58,2
11	10	29,0	12,1	10,5

Tabelle 2: Vergleich von Herz-, Milz- und Thymusgewichten (Naßgewichte) der infizierten Tiere im zeitlichen Verlauf der Infektion mit entsprechenden Gewichten gleichaltriger Kontrolltiere.



Die elektronenmikroskopische Untersuchung ergab weitgehend normale Verhältnisse 3-5 Tage nach Infektion. Vereinzelt wurden regressive Veränderungen an Herzmuskelzellen beobachtet. Viruspartikel waren in diesem Stadium nicht nachweisbar. Ab dem 7. Tag der Infektion lagen in den Zellen auffällige herdförmige entzündliche Infiltrate von Histiozyten und polymorphkernigen Leukozyten vor. In intakten Myozyten und in Nekrosegebieten traten einzelne oder Ansammlungen von Viruspartikeln in sog. "Virusnestern" auf (siehe Abbildung 6).

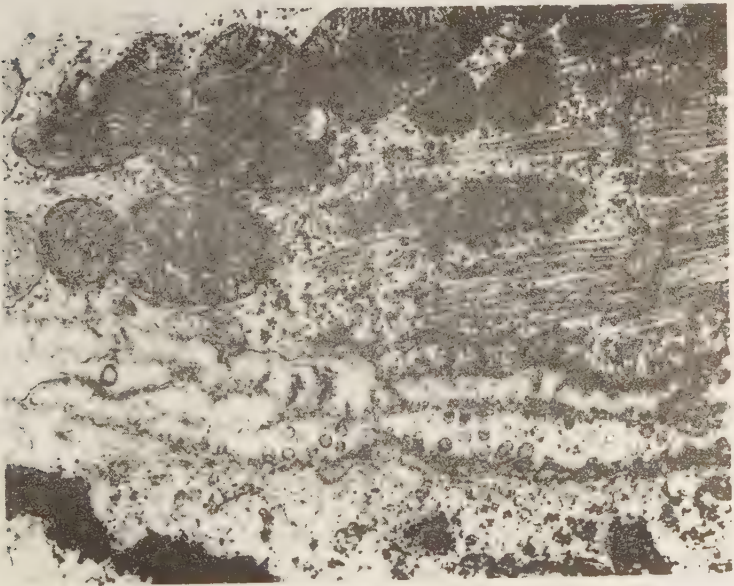


Abb. 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme (18000-fach) eines infizierten Mausmyokards 7 Tage nach Infektion
Ansammlung von Viruspartikeln in einem sog. Virusnest in einer intakten Herzmuskelzelle.

Ab dem 8. Tag nach Infektion setzte verstärkt Nekrosebildung ein. In ausgedehnten nekrotischen Bezirken waren Myofibrillenmuster, Zellorganellen und -membranen völlig zerstört. Die Mitochondrien präsentierten sich als interne "Kalziumdepots", wobei die elektronenmikroskopische Aufnahme kristalline Strukturen erkennen ließ (siehe Abbildung 7).

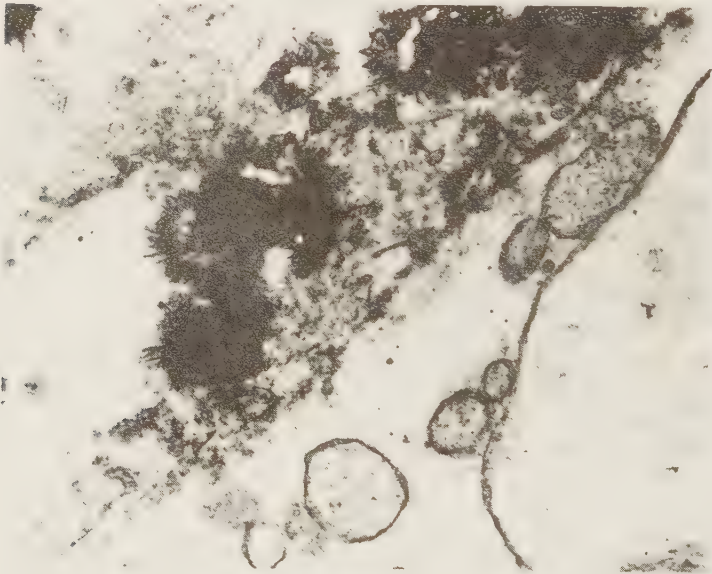


Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme (16000-fach) eines Reo-virus-Typ 3- infizierten Herzens 8 Tage nach Infektion. Aus den defekten Mitochondrien ragen nadelförmige Kalziumverbindungen.

Überwiegend Histozyten mit phagozytierten Zelltrümmern und Viruspartikeln beherrschten das Bild.

Am 12. Tag nach Infektion konnten vereinzelt morphologisch defekte Viruspartikel beobachtet werden (siehe Abbildung 8).

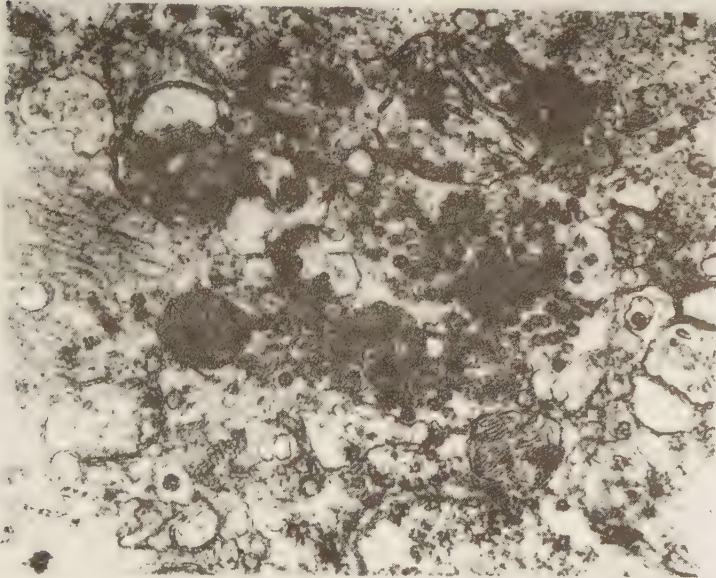


Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines infizierten Mausherzens 12 Tage nach Infektion (22000-fach)

Es liegen überwiegend leere Viruspartikel ohne Genom-RNS vor.

Die Frage nach dem Verbleib der viralen Genom-RNS und damit auch die Möglichkeit der persistierenden Infektion (Integration des viralen Genoms ins Wirts-Genom?) konnten in diesem Fall nicht abgeklärt

werden, da keines der Tiere den 12. Tag der Infektion überlebte.

4.2.2.3 Gesamt-RNS aus den Herzen von Kontroll- und infizierten Tieren (siehe Tabelle 3, Seite 35)

Die Gesamt-RNS der infizierten Herzen vom 3. - 11. Tag nach Infektion wies keine signifikanten Unterschiede zur Gesamt-RNS der Kontrollherzen auf. Sie nahm in beiden Gruppen mit zunehmendem Alter der Tiere ab.

4.2.2.4 Hybridisierung der Gesamt-RNS gegen ^3H -markierte Reovirus-mRNS (s. Tabelle 4, Seite 36)

Die Hybridisierung der Gesamt-RNS beider Gruppen gegen ^3H -markierte Reovirus-mRNS erbrachte für die Kontrollen 4 - 6 Tage nach Geburt, wie schon in 4.2.1 erwähnt, die leicht negativen Differenzen von - 52 cpm (328 cpm $56 \mu\text{g}$ - 380 cpm $0 \mu\text{g}$) und - 87 cpm (310 cpm $75 \mu\text{g}$ - 397 cpm $0 \mu\text{g}$) sowie für die infizierten Herzen + 47 cpm (425 cpm $56 \mu\text{g}$ - 378 cpm $0 \mu\text{g}$) und + 55 cpm (469 cpm $75 \mu\text{g}$ - 414 cpm $0 \mu\text{g}$) am 3. und am 5. Tag nach Infektion. Da diese Ergebnisse noch im Bereich des radioaktiven Hintergrundes liegen, scheint hier der Nachweis viraler Sequenzen zunächst fraglich, wird aber durch Vergleich mit den Kontrollen und durch makroskopische Befunde eher bestätigt.

Am 9. Tag nach Infektion wurde bei der Hybridisierung von 0 - $69 \mu\text{g}$ Gesamt-RNS aus Kontroll- und infizierten Herzen gegen $1,1 \mu\text{g}$ Reovirus-RNS ein Maximum von + 322 cpm (831 cpm $69 \mu\text{g}$ - 509 cpm $0 \mu\text{g}$) bei den infizierten Tieren erreicht, während die Kontrollen nur bei - 25 cpm (364 cpm $69 \mu\text{g}$ - 389 cpm $0 \mu\text{g}$) lagen. Dieses Maximum von + 322 cpm entsprach 53 ng gebundener viraler mRNS.

Wie aus den Tabellen 3 und 4 hervorgeht, wurde im zeitlichen Verlauf der Infektion für die Bestimmung der Gesamt-RNS und nachfol-

Tierexp./ Wurf	Alter (Tage)	Tage nach Infektion	N	Herzgewicht (mg)	Herzgewicht/ Tier (mg)	Gesamt-RNS/ g Hg (μ g)
5/4 K.	4	-	7	130	18,6	7862,46
5/2 i.	4	3	15	180	12,0	6167,73
5/3 K.	6	-	10	210	21,0	7179,66
5/1 i.	6	5	12	250	20,8	8354,72
1 K.	8	-	15	400	26,7	4288,46
1 i.	8	7	19	720	37,9	4980,98
3/7,9 K.	8	-	22	643	29,2	4925,91
3/5,6 i.	8	7	21	614	29,2	4125,44
3/7,9 L.	8	-	22	643	29,2	4925,91
3/4,1 i.	8	7	23	761	33,1	7278,31
5/5 K.	8	-	15	330	22,0	5920,44
5/6 i.	8	7	12	260	21,7	6078,65
5/5 K.	8	-	15	330	22,0	5920,44
5/7 i.	8	7	10	270	27,0	6499,91
x + S _x K.	8	-	18 ± 3	469 ± 144	25,8 ± 3	5196 ± 636
x ± S _x i.	8	7	17 ± 5	525 ± 218	29,8 ± 6	5793 ± 1116
3/3 K.	9	-	5	136	27,1	4986,74
3/8,10,12 i.	9	8	22	540	24,5	5507,87
4/5(2) K.	10	-	6	160	26,0	5746,90
4/1,2 i.	10	9	12	340	27,1	5945,93
4/3 K.	12	-	12	360	30,0	4861,47
4/7 i.	12	11	6	150	25,0	4050,77

Tabelle 3: Isolierung der Gesamt-RNS aus Kontroll- und infizierten Herzen
(siehe 4.2.2.3)

Tierexp./ Wurf	Tage nach Infektion	N	Herzgewicht/ Tier (mg)	Gesamt-RNS/ g Hg (µg)	Gesamt-RNS/ Ansatz (µg)	Differenz xµg -cpm _{0µg})
5/4	K.	7	18,6	7862,46	0 - 56	- 52,2
5/2	i.	15	12,0	6167,73	0 - 56	+ 47,3
5/3	K.	10	21,0	7179,66	0 - 75	- 87,4
5/1	i.	12	20,8	8354,72	0 - 75	+ 54,9
1	K.	15	26,7	4288,46	0 - 94	- 35,6
1	i.	19	37,9	4980,98	0 - 94	+ 195,1
3/7,9	K.	22	29,2	4925,91	0 - 119	- 73,9
3/5,6	i.	21	29,2	4125,44	0 - 119	+ 76,1
3/7,9	K.	22	29,2	4925,91	0 - 119	+ 20,2
3/1,4	i.	23	33,1	7278,31	0 - 119	+ 110,2
5/5	K.	15	22,0	5920,44	0 - 53	- 113,7
5/6	i.	12	21,7	6078,65	0 - 53	+ 79,8
5/5	K.	15	22,0	5920,44	0 - 88	- 21,0
5/7	i.	10	27,0	6499,91	0 - 88	+ 193,1
x + S _x	K.	18 ± 3	25,8 ± 3	5196 ± 636	95 ± 24	- 45 ± 46
x ± S _x	i.	17 ± 5	29,8 ± 6	5793 ± 1116	95 ± 24	+ 131 ± 53
3/3	K.	5	27,1	4986,74	0 - 81	+ 53,7
3/8,10,12	i.	22	24,5	5507,87	0 - 81	+ 206,0
4/5(2)	K.	6	26,0	5746,90	0 - 69	- 24,7
4/1,2	i.	12	27,1	5945,93	0 - 69	+ 322,0
4/3	K.	12	30,0	4861,47	0 - 46	- 61,0
4/7	i.	11	25,0	4050,77	0 - 46	+ 192,6

Tabelle 4: Hybridisierung der Gesamt-RNS aus Kontroll- und infizierten Herzen gegen ³H-markierte Reovirus-mRNS (siehe 4.2.2.4)

gende Hybridisierung ein Naßherzgewicht von mindestens 130 mg eingesetzt (5 - 6 Tiere). Bei der Untersuchung einzelner Herzen am 9. Tag nach Infektion (Herzgewicht 24 - 27 mg) konnte trotz Steigerung der Konzentration an infizierter Gesamt-RNS kein Anstieg an radioaktiven Hybriden gemessen werden. Der Nachweisbereich war offensichtlich überschritten und in Anbetracht des erforderlichen Mindestherzgewichts von etwa 130 mg schied diese Methode als diagnostisches Mittel für die Suche nach Picornaviridae aus, da aus Biopsien von Patienten im günstigsten Fall etwa 1 - 2 mg Herzgewicht zur Verfügung stehen.

4.3 RNS- und Proteinmuster des Typs Dearing

4.3.1 Virale Strukturproteine

Für einen späteren Vergleich mit in-vitro synthetisierten viralen Proteinen wurden die Reovirus-Strukturproteine im denaturierenden SDS-PAA-Gel dargestellt, siehe Abbildung 9.

Je 12,5 µg über Saccharosegradienten gereinigtes Virus wurde in 0,1 % SDS (Reihen 1-3) oder 0,2 % SDS (Reihen 4,5) gekocht und im diskontinuierlichen SDS-PAA-Gel (10%) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Anfärbung der Proteine erfolgte nach Merril, 1981, mit Silbernitrat. Da die ¹⁴C-markierten Standardproteine (Reihen 6,7) nicht durch Silbernitrat anfärbbar sind, wurde von diesen Proteinen eine Autoradiographie angefertigt.

Die aufgetragenen Standardproteine sind: Myosin-H-Kette (200 kD, (Reihe 6), Phosphorylase b (Duplett aus 100 kD und 92,5 kD), Rinderserumalbumin (69 kD), Ovalbumin (46 kD) und Carboanhydrase (30 kD)(Reihe 7). Von den großen λ-Proteinen treten nur Verdauungsprodukte mit einem Molekulargewicht von etwa 10² kD auf, während die Proteine der µ- und σ-Klasse vollständig vorliegen.

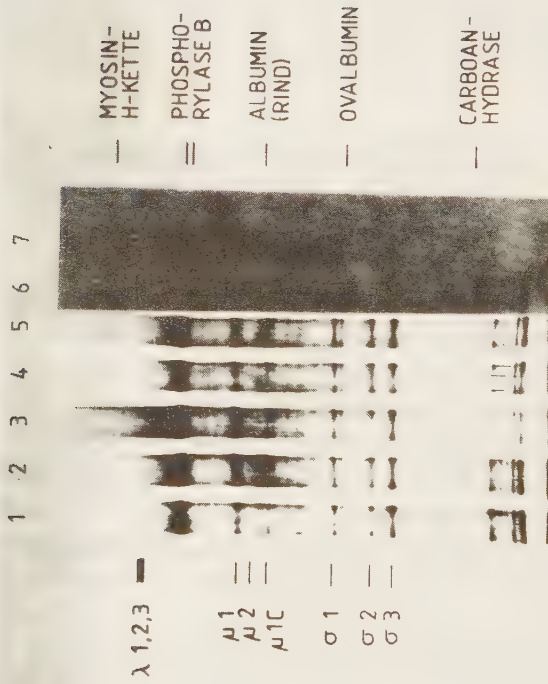


Abb. 9: Strukturproteine des Serotyps 3 (Dearing), siehe 4.3.1

4.3.2 Nachweis virusspezifischer Proteine

4.3.2.1 Translation der mRNS in Retikulozytenlysat mit ^{35}S -Methionin (Mans und Novelli, 1961)

Geeignete Mengen an Reovirus-mRNS (0,6 μg und 1,0 μg) sowie Gesamt-RNS aus Kontroll- und infizierten Herzen (5 μg und 7 μg) wurden in Retikulozytenlysat mit ^{35}S -Methionin zur Translation angeregt. Pro Ansatz wurde je 1 μl der Reaktionsmischung säurepräzipitiert und in 5 ml Szintillationsflüssigkeit auf Toluolbasis gezählt (33 % Ausbeute). Je 1 μl des Translationsansatzes wurde entsprechend in die Geltasche eines diskontinuierlichen 10%igen SDS-PAA-Gels gefüllt und elektrophoretisch getrennt.

Die Autoradiographie (Abbildung 10, S. 40) zeigt die in-vitro gebildeten Proteine der reinen Reovirus-mRNS (Reihen 3-5), sowie der Gesamt-RNS aus Kontroll- und infizierten Herzen (Reihen 6-11). Als Größenmarker dienten dieselben Proteine wie in 4.3.1 beschrieben. Die Säurepräzipitation der ^{35}S -markierten Proteine hatte ergeben, daß verschiedene mRNS-Isolate unterschiedliche Translationsaktivität aufwiesen, wie auch die unterschiedliche Intensität der Banden zum Ausdruck brachte. Die Gesamt-RNS der Kontrollherzen von 8 und 10 Tage alten Mäusen (Reihen 6,7) zeigte eine geringere Syntheserate als die Gesamt-RNS aus infizierten Herzen 7 Tage (Reihe 8), 9 Tage (Reihe 9) und 11 Tage (Reihen 10,11) nach Infektion. Anstelle der großen λ -Proteine traten wieder nur proteolytische Produkte von etwa 10^5 D auf. Die Proteine der μ - und σ -Klasse wurden bis auf $\sigma 3$ von zellulären Proteinbanden überlagert.

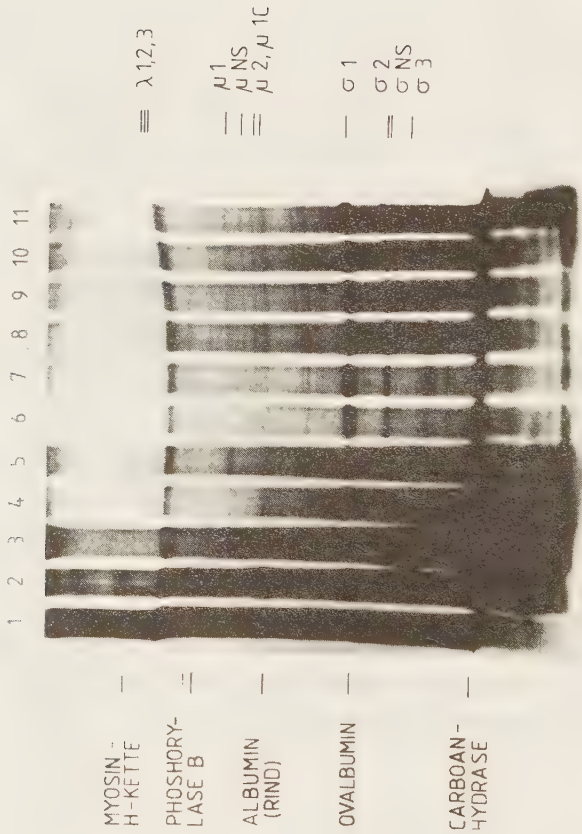


Abb. 10: Autoradiographie der in-vitro synthetisierten Proteine, siehe 4.3.2.1

4.3.2.2 "Immunoblotting" der in-vitro synthetisierten Proteine

Zur Darstellung der viralen Proteine ohne die störenden zellulären Banden wurde die Gesamt-RNS aus Kontroll- und infizierten Herzen in Retikulozytenlysat mit nicht radioaktivem ^{32}S -Methionin translatiert. Die Translationsmischung wurde, wie oben beschrieben, elektrophoretisch getrennt und in einer Trans-Blotzelle von BioRad über Nacht auf Nitrozellulosemembran übertragen (30 V/80 mA). Nach Äquilibration in serumalbuminhaltiger Tris-Kochsalzlösung (TS, pH 7,4) zur Renaturierung der Proteine und zur Absättigung aller übrigen Bindungsstellen auf der Nitrozellulose wurde mit einem gruppenspezifischen Antikörper aus Meerschweinchen (Fa. Dynatech, Denkendorf) belegt. Der Vorteil der Blot-Methode liegt darin, daß durch die Immobilisierung der Proteine an der Oberfläche der Nitrozellulose die antigene Determinante auf 1 reduziert wird, im Gegensatz zur Immunpräzipitation. Auf gründliches Waschen zur Entfernung des überschüssigen Antikörpers erfolgte die radioaktive Markierung mit ^{125}J -Protein A (etwa 1 μCi). Zur Reduktion des Hintergrundes wurde die Nitrozellulose wieder gründlich gewaschen. Nach dem Trocknen wurde eine Autoradiographie angefertigt.

Diese ließ zwar eine verminderte Anzahl von Banden erkennen, aber nicht die viralen, sondern einige der zellulären Proteine waren markiert, wie ein Vergleich zum Duplikat des Blots zeigte, das nach dem Transfer mit Coomassie-Blau gefärbt worden war.

Wenngleich durch die Gruppenspezifität des Antikörpers nur eine Kreuzreaktivität mit dem Serotyp 3 von etwa 50 % zu erwarten war, sollten doch wenigstens die viralen Proteine mit der größten Translationshäufigkeit markiert sein.

Der Versuch wurde wiederholt mit einem typenspezifischen Antikörper (derselben Firma) aus Ziege. Das Ergebnis war dasselbe. Die Proteine der Kontrollherzen waren gleichermaßen wie die der infizierten Herzen markiert. Offensichtlich waren beide Antikörpertypen nicht gegen virale Proteine, sondern gegen Mausproteine gerichtet. Da keine laborinterne Möglichkeit zur eigenen Antikörperproduktion

bestand, wurde auf weitere Wiederholung verzichtet.

4.4 RNS-Gelelektrophorese zum Nachweis viraler Genom- bzw. mRNS-Segmente

Je 3-5 µg Reovirus Typ 3 (Reihe 1) Reovirus-mRNS (Reihen 6-8) und Gesamt-RNS aus Kontroll- und infizierten Herzen (Reihen 4,5) wurden der denaturierenden Elektrophorese (7 M Harnstoff, 2 % Agarose) unterworfen, siehe Abbildung 11. Als Größenmarker dienten ribosomale RNS-Einheiten aus *E. Coli* mit 23 S und 16 S (Reihen 3,9) sowie Kalbsleber-tRNS mit etwa 5 S (Reihen 2,10). Nach dem Lauf wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht mit einer Sofortbildkamera (Polaroid CU 5) photographiert. Die in (Reihe 4) und (Reihe 5) aufgetragene Gesamt-RNS aus Kontroll- und infizierten Herzen (10 Tage bzw. 9 Tage nach Infektion) war bereits, wie in Tabelle 4 und 4.3.2.1 beschrieben, durch Hybridisierung und Translation auf virale Sequenzen ausgetestet worden. Die vorhandenen viralen Banden in (Reihe 5) werden offensichtlich durch die Fluoreszenz der zellulären rRNS und mRNS überdeckt, wogegen das Fehlen dieser RNS-Spezies in (Reihe 4) der Kontrollherzen zeigt, daß die Gesamt-RNS während der Arbeit durch RNase kontaminiert wurde.

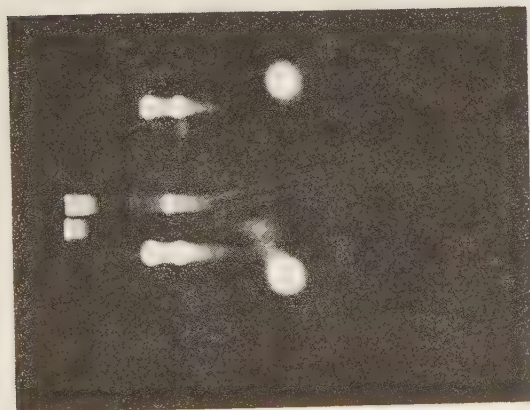
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

($2,5-2,7 \times 10^6$ D) l —
 ($1,4-1,6 \times 10^6$ D) m —
 ($0,6-0,8 \times 10^6$ D) s ≡

REOVIRUS TYP 3

mRNS (6-8)

GENOM - RNS (1)



° MAUS (4, 5)
 rRNS 28S ($1,7 \times 10^6$ D) °
 rRNS 23S ($1,1 \times 10^6$ D) *
 rRNS 16S ($0,6 \times 10^6$ D) *
 rRNS 18S ($0,7 \times 10^6$ D) °
 — tRNS - 5S (35×10^3 D)
 KALBSLEBER (2,10)
 * E. COLI (3,9)

Abb. 11: Agarose-Harnstoff-Gelelektrophorese zur Darstellung von Ribonukleinsäuresegmenten, siehe 4,4

4.5 Der Einfluß von Maus- $(\alpha + \beta)$ -Interferon auf symptomatische Myokarditis

Die ursprünglich entdeckte Aktivität des Interferons war die Störung der Replikation verschiedener Viren und führte daher zu seiner Bezeichnung (Lengyel, 1982). Trotz der Zuordnung weiterer wichtiger Einflüsse auf Zellmotilität, Zellproliferation und eine Reihe von immunologischen Prozessen blieb Interferon ein bedeutendes antivirales Agens, da es Tiere vor Infektionen schützen kann, wenn es prophylaktisch injiziert wird (Stewart, 1979).

Die Möglichkeit einer prophylaktischen Behandlung der neonatalen Mäuse schied aus, da es auf neugeborene Mäuse toxisch wirkt (Gresser, 1975). Daher wurden die Mäuse mit der üblichen Dosis ($10 \mu\text{g}/4 \mu\text{l}$ Virussuspension) 12 - 36 Stunden nach Geburt intraperitoneal infiziert und erhielten nach Entwicklung der symptomatischen Myokarditis (ab Tag 6 nach Infektion) Maus- $(\alpha + \beta)$ -Interferon, wobei 2x4 Würfen an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10 Einheiten pro $10 \mu\text{l}$ pro Tier appliziert wurden. Von jedem Wurf wurde täglich nach Interferongabe ein Tier getötet, das Herz entnommen und elektronenmikroskopisch untersucht. Als Kontrollkollektiv dazu dienten infizierte unbehandelte Mäuse.

Keines der behandelten Tiere überlebte den 13. Tag der Infektion. Die Mäuse mit der höchsten Dosis starben bereits 9 Tage nach Infektion, es folgten die unbehandelten Kontrolltiere ab dem 9. bis 12. Tag nach Infektion und die Tiere mit je 10^3 Einheiten Interferon. Die meisten Tiere, denen 10^2 oder 10 Einheiten Interferon verabreicht worden war, starben ab dem 11. bis zum 13. Tag nach Infektion. Es schien, als seien die niedrigeren Dosen verträglicher und verzögerten den Tod um etwa 2 Tage (Stangl et al., 1986).

Die Elektronenmikroskopaufnahmen von Interferon-behandelten und Kontrolltieren zeigten jedoch ein vergleichbares Ausmaß an Zellschädigung 10 Tage nach Infektion. In beiden Fällen herrschte überwiegend eine histiozytäre Abraumreaktion vor, wobei die Zellorganellen und -membranen weitgehend zerstört waren (siehe Abbildung 12).

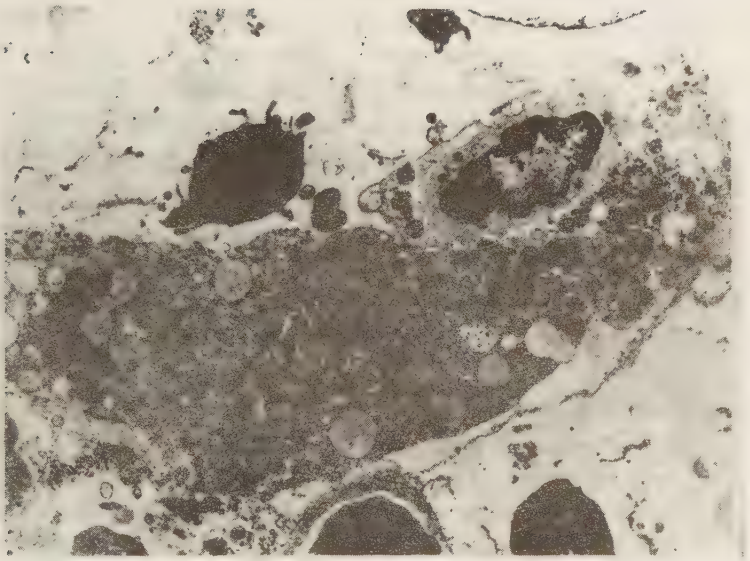


Abb. 12: Elektronenmikroskop-Aufnahme eines infizierten und Interferon-behandelten Mausmyokards 10 Tage nach Infektion (1875-fach)

Die Zelle ist bereits verfettet und mit Viruspartikeln übersät. Gewebsmakrophagen enthalten phagozytierte Debris.

Die Behandlung infizierter Tiere mit Interferon wurde unter denselben Bedingungen wiederholt. Die Ergebnisse stimmten in beiden Experimenten überein.

4.6 Infektion isolierter Herzmuskelzellen mit Reovirus Typ 3 (Stamm Dearing)

Bei der intraperitonealen Infektion neonataler Mäuse erreicht Reovirus Typ 3 über Blut- und/oder Nervenbahnen die Innenorgane, in denen es fast ausnahmslos replizieren kann (Stanley, 1974; Walters et al., 1963; Man Sung Co et al., 1985). Die Entwicklung einer Myokarditis tritt dabei nur als ein Symptom einer generalisierten Virusinfektion auf, obwohl sie bei dem hier verwendeten Serotyp überwiegt (Walters et al., 1963). Durch die Präparation neonataler Mausherzmuskelzellen, eine der Präparation neonataler Rattenherzmuskelzellen adaptierte Methode, bot sich daher die Möglichkeit, eine gezielte Infektion spontan kontrahierender Herzmuskelzellen durchzuführen und den Verlauf der Infektion mikroskopisch zu verfolgen.

Herzmuskelzellen mit gleicher Einsaat (25000 Zellen pro 25 cm² Nunc-Zellkulturflasche), aber mit verschiedenen Präparationsdaten, wurden 1 Tag bzw. 9 Tage nach Präparation ins Institut für Hämatologie der GSF verlegt und am darauffolgenden Tag infiziert. Die Infektion der Zellen und die Dokumentation erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Dr. I. Ziegler im selben Institut.

Insgesamt wurden in Duplikaten 8 Kulturflaschen, die frisch präparierte Zellen enthielten, mit je 10 µg, 100 ng und 10 ng pro 4 µl pro Flasche, 6 Kulturflaschen 10 Tage alter Zellen mit 10 µg, 1 µg und 100 ng pro 4 µl pro Flasche sowie Fibroblasten aus beiden Präparationen mit je 10 µg pro 4 µl pro Flasche infiziert.

Als Kontrollen dazu dienten nicht-infizierte Zellen mit gleichem Präparationsdatum. In Abständen von 2 Stunden wurden die infizierten Zellen unter dem inversen Phasenkontrastmikroskop auf infektionsbedingte Veränderungen untersucht und fotografiert.

Bei den frisch präparierten Zellen traten erste Anzeichen der Infektion nach etwa 30 Stunden auf. Die spontane Kontraktionsfrequenz, die vor der Infektion zwischen 40-60 Kontraktionen pro Minute lag (mit Hilfe einer Stoppuhr ermittelt), steigerte sich bis etwa 40 Stun-

den nach Infektion fast auf das Doppelte. Die zuvor adhären-ten und gut ausdifferenzierten Zellen bekamen eine rauhe Oberfläche, rundeten sich teilweise ab, verdickten sich und schienen geradezu zu pulsieren. Während der folgenden 10 Stunden variierte die Kontraktionsfrequenz noch einige Male, erreichte jedoch nicht das obige Maximum. Zwischen 50 und 60 Stunden nach Infektion kontrahierten die Zellen nur noch schwach. Einige rollten sich bereits ein und lösten sich ab. Die Kerne der noch lebenden Zellen waren deutlich abgegrenzt. Die Freisetzung des Zelleninhalts sterbender Zellen beschleunigte die Lyse der ganzen Kultur.

Die verschiedenen Infektionsdosen kamen während des Versuchs nicht zum Tragen. Der lytische Prozeß war in allen frischen Zellkulturen 60 Stunden nach Infektion abgeschlossen. Entsprechend, aber im Reaktionsverlauf etwa um 12 Stunden verzögert, verlief die Infektion bei den 10 Tage alten Zellkulturen.

Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß die 2 Tage alten Kulturen die durch tryptische Einwirkung entstandenen Zellschäden zum Zeitpunkt der Infektion noch nicht vollständig regeneriert hatten und daher (in Kombination mit dem Streß des Transports) dem viralen Angriff weniger Widerstand leisten konnten.

Wahrscheinlicher jedoch ist, daß in den älteren, teilweise schon konfluenten Kulturen der Adsorptionsprozeß der Viruspartikel langsamer abläuft als in den frischen Kulturen mit isolierten Zellen.

Bei den Fibroblasten beider Kulturen zeigten sich Anzeichen der Infektion durch Vakuolenbildung etwa 36 Stunden nach Infektion. Der anfänglich dichte Zellrasen wies zunehmend Löcher auf, wobei sich die Zellen ebenfalls abrundeten und verdickten. Der lytische Prozeß setzte ab 50 Stunden nach der Infektion ein.

Abb. 13: Fibroblasten und Myoblasten 5 Tage nach Präparation
(475-fach)

Die Myoblasten schlagen teilweise isoliert oder synchron
(Seite 49 oben).

Abb. 14: Sterbende Myoblasten mit beginnender Lyse (400-fach)
60 Stunden nach Infektion mit Reovirus Typ 3, 5 Tage nach
Präparation (Seite 49 unten)

Abb. 15: Fibroblastoide Zellen (200-fach),
3 Tage nach Präparation (Seite 50 oben)

Abb. 16: Reovirus Typ 3 infizierte Fibroblasten (250-fach)
5 Tage nach Präparation, 3 Tage nach Infektion
(Seite 50 unten)

Siehe dazu Text Seiten 46 und 47

Abbildungen nächste Seiten.



Abb. 13 (oben, 475-fach) und Abb. 14 (unten, 400-fach)

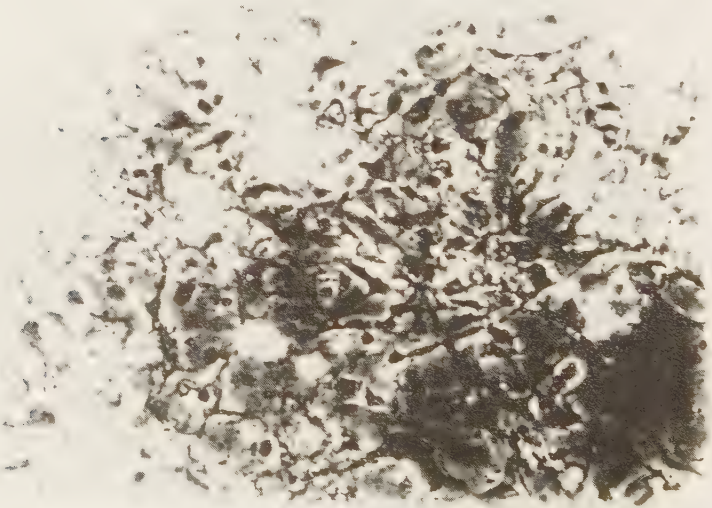
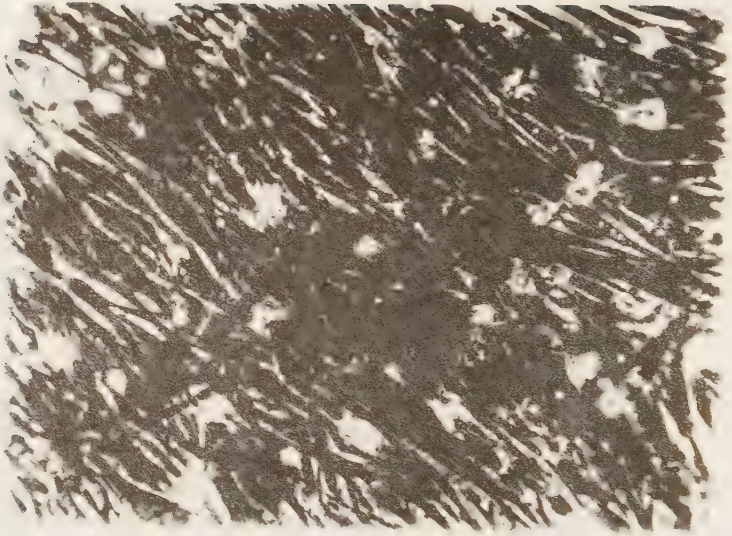


Abb. 15 (oben, 200-fach) und Abb. 16 (unten, 250-fach)

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Reovirus Serotyp 3 (Dearing) in neonatalen Mäusen (1-3 Tage nach Geburt) bei intraperitonealer Injektion eine fatale Infektion verursacht, die sich überwiegend als Myokarditis und gelegentlich als Enzephalitis manifestiert, und in deren Verlauf alle Tiere ab dem 9. - 12. Tag nach Infektion sterben.

Der hier verwendete Virusstamm erwies sich auch bei Verdünnung der Infektionsdosis um $1:10^3$ als hochvirulent. Die Autopsie ergab identische Befunde 7 Tage nach Infektion bei Tieren, die je $10 \mu\text{g}/4 \mu\text{l}$ bis $10 \text{ ng}/4 \mu\text{l}$ Virussuspension erhalten hatten (unveröffentlichte Befunde).

Das Alter der Versuchstiere bestimmt bei Reovirusinfektionen ebenso wie bei anderen Virusinfektionen entscheidend den Verlauf der Krankheit (Willey und Ushijima, 1981; Rager-Zisman und Allison, 1973 a und b). Während die Sterblichkeitsrate der Mäuse, die 12 - 36 Stunden nach Geburt infiziert worden waren, bei 100% lag, zeigten 6 Tage alte Mäuse bereits keine Symptome mehr (unveröffentlichte Befunde). Die Replikation der Reoviren scheint daher nach allgemeiner Auffassung nur in immunologisch unreifen oder prädisponierten Wirten stattfinden zu können, wobei das lymphoide System entweder zerstört oder zumindest verändert wird (Stanley, 1974).

Die immunologische Unreife der neonatalen Mäuse äußert sich durch einen Mangel an funktionellen Makrophagen, an funktionellen T-Helfer-Zellen und durch einen Überschuß an T-Suppressor-Zellen, wobei die überschüssige T-Suppressor-Zellaktivität der neonatalen Milz vermutlich für die mangelnde T-Helfer-Zellaktivität verantwortlich ist (Argyris, 1977). Obwohl der Mechanismus der Resistenz gegen eine virale Infektion, den reife Mäuse entwickeln, nicht genau bekannt ist, scheinen die T-Lymphozyten eine Schlüsselfunktion zu besitzen, da eine Behandlung bereits resistenter Mäuse mit Anti-Lymphozytenserum die Fähigkeit zur Virusreplikation wiederherstellte

(Willey und Ushijima, 1981).

Eine Begleiterscheinung der Reovirus-Typ-3-Infektion sind abnorm hohe Kortikoidspiegel, die möglicherweise zum verzögerten Wachstum der infizierten Tiere und zur Atrophie von Milz und Thymus führen (siehe Tabelle 2, Seite 29).

Der Verlauf der Infektion wurde durch Anwendung mehrerer Methoden dokumentiert. Bereits mit dem bloßen Auge konnte man ab dem 5. Tag nach Infektion gelblich-weiße Nekrosen an der Myokardoberfläche erkennen. Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Kryostatschnitte (Dicke 6 μm) demonstrierten 7 Tage nach Infektion bei 160-facher Vergrößerung entzündliche Infiltrate und ausgedehnte Nekrosebereiche mit Auflösung des Myofibrillenmusters in infizierten Herzen.

Die Präsenz von Viruspartikeln wurde durch Elektronenmikroskopaufnahmen (16000-22000-fach) in noch intakten Herzmuskelzellen und in Nekrosegebieten bestätigt.

Charakteristische Merkmale der Zellschädigung waren ein teilweiser oder vollständiger Verlust des kontraktilen Gewebes, Einlagerung von Fetttropfen, Auflösung und/oder totale Kalzifizierung der Mitochondrien, sowie Einwanderung von Histiozyten, die eine phagozytäre Abräumreaktion einleiteten. Die zunehmende Verfettung der Herzmuskelzellen durch Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums und die Verkalkung der Mitochondrien sind möglicherweise auch auf die hohen Kortikoidspiegel zurückzuführen (Ortega und Mas-Oliva, 1986).

Als zuverlässige und sensitive Methode zum Nachweis viraler Genom-RNS in der Gesamt-RNS aus infizierten Herzen erwies sich die molekulare Hybridisierung.

Da die Tritium-markierte Reovirus-mRNS nur in begrenzter Menge zur Verfügung stand, wurde die Menge pro Hybridisierungsansatz auf 1,1 μg mRNS (etwa 5000 - 6000 cpm) reduziert. Damit war die Empfindlichkeit der Methode so festgelegt, daß erst ab dem 7. Tag nach Infektion ein deutlicher Anstieg an säurepräzipitierten Hybriden gemessen werden konnte.

Im Schnitt wurden etwa 20 ng gebundener mRNS 7 Tage nach Infektion ermittelt (siehe Abschnitt 3.6 und Tabelle 4).

Ein annähernd quantitativer Austausch der markierten mRNS gegen den gleichpoligen (+)-Strang der viralen Genom-RNS kann nur erfolgen, wenn die markierte mRNS in großem Überschuß vorliegt. Durch den Einsatz größerer Mengen an radioaktiver mRNS oder auch durch Verwendung von spezifisch hochmarkierter mRNS oder komplementärer DNS (cDNS) könnte die Sensivität dieser Methode entscheidend erhöht werden. Damit würde sich die Methode unter Umständen als diagnostisches Mittel zum Nachweis von Picornavirus-spezifischen Sequenzen im infizierten Myokard eignen.

Diskutiert wird in diesem Zusammenhang eine modifizierte Form dieser Hybridisieretechnik, die sog. "in-situ"-Hybridisierung, bei der man direkt im Kryostatschnitt ohne vorherige Extraktion der Gesamt-RNS virale Sequenzen durch spezifisch-hochmarkierte cDNS nachweisen kann. Mit Hilfe dieser Methode sind virale Sequenzen im Picogramm-Bereich aufspürbar, sie ist daher sensitiv genug, um menschliche Endomyokardbiopsien mit 0,5 - 2 mg Naßgewicht auf virale Sequenzen auszutesten. Als diagnostisches Mittel ist sie jedoch nur bedingt einsetzbar, da die Autoradiographie solcher Kryostatschnitte etwa 2-4 Wochen in Anspruch nimmt (Wilmes und Wolf, 1981). Wie von mehreren Arbeitsgruppen berichtet, ist Reovirus Typ Dearing ein ausgezeichnete Induktor von ($\alpha + \beta$)- Interferon (Miyamoto und Samuel, 1980; Nilsen et al., 1983; De Benedetti et al., 1985).

Interferon reduziert die virale Replikation auf 20 - 40 %, wenn es verschiedenen Zellarten 12-24 Stunden vor Infektion zugesetzt wird. Die antivirale Wirkung des Interferons beruht auf dem Errichten eines transienten "antiviralen Status" in der Zelle. Interferon bindet als Signalligand an geeignete Rezeptoren der Zelloberfläche, wobei α - und β -Interferon (Leukozyten- und Fibroblasten-Interferon) um die Bindung an denselben Rezeptor konkurrieren. Der Interferon-Rezeptor-Komplex führt zur Veränderung der RNS- und Proteinsynthese in der Zelle.

Der früheste erkennbare Effekt des Interferons ist ein intrazelluläre

Ca^{2+} -abhängige Steigerung der (3'-5')cGMP-Synthese. Von den zyklischen Nukleotiden nimmt man heute an, daß sie intrazelluläre Vermittler von extrazellulären Signalen darstellen (second messenger). Wie cAMP aktiviert auch cGMP spezifische Proteinkinasen und moduliert möglicherweise die intrazelluläre Reaktion auf erhöhte freie Kalziumkonzentrationen im Zytosol.

Die Induktion eines komplexen Enzymsystems stellt jedoch den Hauptfaktor des "antiviralen Status" dar. Das erste Enzym dieses Systems, die (2'-5')-Oligo (A)-Synthetase erzeugt in Gegenwart von dsRNS aus ATP (2'-5')-verknüpfte Oligoadenylate mit einer Kettenlänge bis zu 15 Nukleotiden. Ab $n = 4$ aktivieren diese Oligoadenylate eine latente RNase (RNase L), die bevorzugt ssRNS an bestimmten Stellen degradiert. Auf diese Weise wird vorübergehend die Translation der zellulären und viralen mRNS eingestellt und damit die Virusreifung verhindert. Die ungewöhnliche (2'-5')-Verknüpfung erfordert zur Spaltung eine spezielle Phosphodiesterase, die unter anderem auch tRNS an bestimmten Stellen spalten kann. Die Aktivierung einer dsRNS-abhängigen Proteinkinase mit Hilfe von ATP (möglicherweise durch cGMP vermittelt, siehe vorherige Seite) führt zur Phosphorylierung des Peptidketten-Initiationsfaktors eIF-2, wodurch die Proteinsynthese und damit die Virusreplikation inhibiert wird.

Der "antivirale Status" kann nicht in Zellen errichtet werden, in denen die RNS-Synthese bereits inhibiert ist.

Die Toxizität von Interferon für Mäuse unter 8 Tagen einerseits und die Resistenz 6 Tage alter Mäuse gegen eine Reovirusinfektion andererseits führten zur Kompromißlösung, die therapeutische Wirkung von Interferon bei bereits bestehender Myokarditis zu erproben. Daher erhielten die wie üblich infizierten Tiere ab dem 6. Tag nach Infektion an drei aufeinanderfolgenden Tagen verschiedene Dosen Maus-($\alpha + \beta$)-Interferon. Obwohl niedrige Dosen verträglicher schienen und den Tod um zwei Tage verzögerten, waren die ultra-strukturellen degenerativen Veränderungen der infizierten und Interferon-behandelten Herzen vergleichbar.

Eine Deutung dieses Befundes kann anhand der Wirkungsweise von

Interferon erbracht werden. Die Erzeugung des "antiviralen Status" erfordert eine Umstellung der zellulären mRNS- und Proteinsynthese. Wenn die zelluläre Transkription und Translation durch die Infektion schon stark inhibiert ist und der zelluläre Translationsapparat auf Produktion viraler Proteine umgestellt ist, kann kein "antiviraler Status" errichtet werden (siehe oben). Das verzögerte Einsetzen des Todes läßt jedoch die Vermutung zu, daß zumindest in den noch nicht befallenen Zellen des Myokards der "antivirale Status" vorübergehend errichtet wurde. Da aber das Ausmaß der Gewebsschädigung bereits ein kritisches Stadium erreicht hatte, verendeten die Tiere an den Folgen ihrer Herzinsuffizienz, die sich aus der Myokarditis entwickelt hatte.

Das Verhalten isolierter Herzmuskelzellen aus neonatalen Mäusen lieferte zusätzliche wertvolle Informationen über den Ablauf der Reovirusinfektion. Wie erwähnt, bindet zuerst das virale Hämagglutinin an β -adrenerge Rezeptoren der Zelloberfläche und vermittelt die Phagozytose von Viruspartikeln, die über Vakuolen in Lysosomen gelangen und dort enzymatisch aktiviert werden. Bei Entleerung dieser Vesikel beginnt der replikative Zyklus in der Zelle.

Der Anstieg der Kontraktionsfrequenz und die morphologischen Veränderungen der Zellen deuten darauf hin, daß die virale Penetration die Wirkung einer adrenergen Stimulation erzeugt. Die raue Oberfläche der Zellen, unter dem Mikroskop als Ausstülpungen oder Blasen sichtbar, tritt gewöhnlich als Folge der gestörten Myokarderregung an den Herzmuskelzellmembranen auf und wurde bisher für ischämische oder hypoxische Bedingungen, sowie für Störungen des Kalium- oder Kalziumhaushalts der Zelle beschrieben (Goshima et al., 1978; Flöhl, 1984; Ver Donck et al., 1985). Die Ausstülpungen stellen ein Maß für die Zellschädigung dar, da sie bei Aufrechterhalten der pathologischen Bedingungen stark zunehmen, Enzyme absondern, und bei Wiederherstellung der physiologischen Bedingungen rückbildungsfähig sind. Da die Kontraktionsfrequenz zwar durch einige Refraktärperioden unterbrochen wurde, aber mehrmals wieder anstieg, scheint die Infektion eine Art Dauererregung zu erzeugen,

die mit zunehmender Zellschädigung abgeschwächt wird. Infolge dieser Dauererregung erhöht sich die intrazelluläre Kalziumkonzentration, wodurch die Zellorganellen, die mit der Verteilung des Kalziums (wie Bindung an Calmodulin, Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum) überlastet sind, degenerieren. Ein überzeugendes Beispiel dieser Hypothese liefern Elektronenmikroskopaufnahmen infizierter Herzen im Spätstadium der Infektion, in denen sich die Mitochondrien als interne Kalziumdepots (siehe S. 32) präsentieren.

Die logische Konsequenz der experimentellen Befunde wäre nun, die Wirksamkeit einer β -adrenergen Blockade oder chemischen Modifizierung der viralen Rezeptoren bei einer Reovirus-Typ 3-Infektion zu testen. Da bisher nur ein gut funktionierendes Immunsystem den Schutz vor einer viralen Erkrankung gewährleistet, stellt sich allgemein die Frage, ob nicht unter Umständen virale Rezeptoren als pharmakologische Ansatzpunkte herangezogen werden könnten, wenn die Antikörperbildung unzureichend ist.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Infektion neonataler Mäuse mit Reovirus Serotyp 3 (Stamm Dearing) reproduzierbar eine Virusmyokarditis erzeugt, in deren Verlauf die Tiere vom 9. - 12. Tag nach Infektion sterben. Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen, sowie die molekulare Hybridisierungstechnik demonstrierten eindeutig am 7. Tag nach Infektion die Anwesenheit von Viruspartikeln bzw. von viralen Sequenzen, die am 9. Tag nach Infektion ein Maximum erreichten. Die Gabe von Maus-($\alpha+\beta$)-Interferon bei symptomatischer Virusmyokarditis konnte den fatalen Verlauf der Myokarditis nicht zum Stillstand bringen, sondern verzögerte nur das Ableben der Tiere um 2 Tage.

Die Infektion isolierter neonataler Mausherzmuskelzellen deutet darauf hin, daß die Adsorption des viralen Hämagglutinins oder der Viruspartikel an β -adrenerge Rezeptoren eine Art Dauererregung verursacht, in deren Folge die Zellen durch Überlastung degenerieren.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmed, R., and Fields, B.N. (1982). Role of the S4 Gene in the Establishment of Persistent Reovirus Infection in L Cells. *Cell* **28**, 605-612
- Argyris, B.F. (1978). Suppressor Activity in the Spleen of Neonatal Mice. *Cell. Immunol.* **36**, 354-362
- Armstrong, G.D., Paul, R.W., and Lee, P.W.K. (1984). Studies on Reovirus Receptors of L Cells: Virus Binding Characteristics and Comparison with Reovirus Receptors of Erythrocytes. *Virology* **138**, 37-48
- Astell, C., Silverstein, S.C., Levin, D.H., and Acs, G. (1972). Regulation of the Reovirus RNA Transcriptase by a Viral Capsomere Protein. *Virology* **48**, 648-654
- Bassel-Duby, R., Jayasuriya, A., Chatterjee, D., Sonenberg, N., Maizel, J.V., and Fields, B.N. (1985). Sequence of reovirus haemagglutinin predicts a coiled-coil structure. *Nature* **315**, 421-423
- Bell, T.M., Massie, A., Ross, M.G.R., Simpson, D.I.H., and Griffin, E. (1966). Further isolations of reovirus type 3 from cases of Burkitt's lymphoma. *Br. Med. J.* **5502**, 1514-1517
- Bellamy, A.R., Nichols, J.L., and Joklik, W.K. (1972). Nucleotide Sequences of Reovirus Oligonucleotides: Evidence for Abortive RNA Synthesis during Virus Maturation. *Nature New Biol.* **238**, 49-51

- Bellamy, A.R., Shapiro, L., August, J.T., and Joklik, W.K. (1967).
Studies on Reovirus RNA. I. Characterization of Reovirus
Genome RNA. *J. Mol. Biol.* **29**, 1-17
- Blondel, B., Roijen, J., and Cheneval, J.P. (1971). Heart cells in cul-
ture: A simple method for increasing the proportion of myo-
blasts. *Experientia* **27**, 356-358
- Both, G.W., Lavi, S., and Shatkin, A.J. (1975). Synthesis of All the
Gene Products of the Reovirus Genome in Vivo and in Vitro.
Cell **4**, 173-180
- Burnette, W.N. (1981). "Western Blotting": Electrophoretic Transfer
of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels
to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with
Antibody and Radioiodinated Protein A. *Anal. Biochem.* **112**,
195-203
- De Benedetti, A., Williams, G.J., Comeau, L., and Baglioni, C. (1985).
Inhibition of Viral mRNA Translation in Interferon-Treated
L Cells Infected with Reovirus. *J. Virol.* **55**, 588-593
- Drayna, D., and Fields, B.N. (1982). Activation and Characterization
of the Reovirus Transcriptase: Genetic Analysis. *J. Virol.* **41**,
110-118
- Epstein, R.L., Powers, M.L., Rogart, R.B., and Weiner, H.L. (1984).
Binding of ¹²⁵I-labeled Reovirus to Cell Surface Receptors.
Virology **133**, 46-55
- Ernst, H., and Shatkin, A.J. (1985). Reovirus hemagglutinin mRNA
codes for two polypeptides in overlapping reading frames.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 48-52

- Fields, B.N. (1985). Genetics of reovirus virulence. *Trends in Genetics* **1**, 284-287
- Finberg, R., Weiner, H.L., Fields, B.N., Benacerraf, B., and Burakoff, S.J. (1979). Generation of cytolytic T lymphocytes after reovirus infection: Role of S1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 442-446
- Floehl, R. (1984). Herzmuskelzellen im Reagenzglas. *Frankfurter Allgemeine Zeitung* Nr. **51** vom 29.2.1984, Seite 27
- Fontana, A., and Weiner, H.L. (1980). Interaction of reovirus with cell surface receptors. II. Generation of suppressor T cells by the hemagglutinin of reovirus type 3. *J. Immunol.* **125**, 2660-2664
- Gillies, S., Bullivant, S., and Bellamy, A.R. (1971). Viral RNA Polymerases: Electron Microscopy of Reovirus Reaction Cores. *Science* **174**, 694-696
- Gomatos, P.J., Stamatos, N.M., and Sarkar, N.H. (1980). Small Reovirus-Specific Particle with Polycytidylate-Dependent RNA Polymerase Activity, *J. Virol.* **36**, 556-565
- Gomatos, P.J., Prakash, O., and Stamatos, N.M. (1981). Small Reovirus Particles Composed Solely of Sigma NS with Specificity for Binding Different Nucleic Acids. *J. Virol.* **39**, 115-124
- Goshima, K., Yamanaka, H., Eguchi, G., and Yoshino, S. (1978). Morphological changes of cultured myocardial cells due to change in extracellular calcium ion concentration. *Develop., Growth and Differ.* **20**, 191-204

- Gresser, I., Tovey, M.G., Maury, C., and Chouroulinkov, I. (1975). Lethality of interferon preparations for newborn mice. *Nature* **258**, 76-78
- Harary, I., Hoover, F., and Farley, B. (1974). The isolation and cultivation of rat heart cells. *Methods Enzymol.* **32**, 740-745
- Huismans, H., and Joklik, W.K. (1976). Reovirus-Coded Polypeptides in Infected Cells: Isolation of Two Native Monomeric Polypeptides with Affinity for Single-Stranded and Double-Stranded RNA, Respectively. *Virology* **70**, 411-424
- Jackson, G.G., and Muldoon R.L. (1973). Viruses causing common respiratory infections in man. IV. Reoviruses and adenoviruses. *J. Infect. Dis* **128**, 811-822
- Joklik, W.K., (1974). Reproduction of Reoviridae; in: *Comprehensive virology* (eds. Fraenkel-Conrat, H., and Wagner, R.R.), vol. **2**, Plenum Press, New York, pp 297-334
- Joklik, W.K. (1981). Structure and Function of the Reovirus Genome. *Microbiol. Rev.* **45**, 483-501
- Joske, R.A., Keall, D.D., Leak, P.J., Stanley, N.F. and Walters, M.N.I. (1964). Hepatitis-encephalitis in humans with reovirus infection. *Arch. intern. Med.* **113**, 811-816
- Kasten, F.H. (1973). Mammalian myocardial cells; in: *Tissue culture methods and applications* (eds. Kruse, P.F., and Patterson, M.K.), Academic Press, New York, 72-81
- Kavenoff, R., Talcove, D., and Mudd, J.A. (1975). Genome-sized RNA from reovirus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4317-4321

- Lee, P.W.K., Hayes, E.C., and Joklik, W.K. (1981). Protein $\sigma 1$ Is the Reovirus Cell Attachment Protein. *Virology* **108**, 156-163
- Lengyel, P. (1982). Biochemistry of interferons and their actions. *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 251-282
- Luftig, R.B., Kilham, S.S., Hay, A.J., Zweerink, H.J., and Joklik, W.K. (1972). An Ultrastructural Study of Virions and Cores of Reovirus Type 3. *Virology* **48**, 170-181
- Man Sung Co, Gaulton, G.N., Tominaga, A., Homcy, C.J., Fields, B.N., and Greene, M.I. (1985). Structural similarities between the mammalian β -adrenergic and reovirus type 3 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5315-5318
- Mans, R.J., and Novelli, G.D. (1961). Measurement of the Incorporation of Radioactive Amino Acids into Protein by a Filter-Paper Disk Method. *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 48-53
- McCrae, M.A., and Joklik, W.K. (1978). The Nature of the Polypeptide Encoded by Each of the 10 Double-Stranded RNA Segments of Reovirus Type 3. *Virology* **89**, 578-593
- Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A., and Ebert, M.H. (1981). Ultrasensitive Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels Shows Regional Variation in Cerebrospinal Fluid Proteins. *Science* **211**, 1437-1438
- Miyamoto, N.G., and Samuel, C.E. (1980). Mechanism of Interferon Action. Interferon-Mediated Inhibition of Reovirus mRNA Translation in the Absence of Detectable mRNA Degradation but in the Presence of Protein Phosphorylation. *Virology* **107**, 461-475

- Mora, M., and Carter, C.A. (1983). The Role of Phosphoproteins in Reovirus Morphogenesis; in: Double-Stranded RNA Viruses (eds. Compans, R.W., and Bishop, D.H.L.), Elsevier Biomedical, New York, Amsterdam, Oxford, pp 207-211
- Morgan, E.M., and Kingsbury, D.W. (1980). Pyridoxal Phosphate as a Probe of Reovirus Transcriptase. *Biochemistry* **19**, 484-489
- Mustoe, T.A., Ramig, R.F., Sharpe, A.H., and Fields, B.N. (1978). Genetics of Reovirus: Identification of the dsRNA Segments Encoding the Polypeptides of the μ and σ Size classes. *Virology* **89**, 594-604
- Nichols, J.L., Bellamy, A.R., and Joklik, W.K. (1972). Identification of the Nucleotide Sequences of the Oligonucleotides Present in Reovirions. *Virology* **49**, 562-572
- Nilsen, T.W., Maroney, P.A., and Baglioni, C. (1983). Maintenance of Protein Synthesis in Spite of mRNA Breakdown in Interferon-Treated HeLa Cells Infected with Reovirus. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 64-69
- Ortega, A., and Mas-Oliva, J. (1986). Direct Regulatory Effect of Cholesterol on the Calmodulin Stimulated Calcium Pump of Cardiac Sarcolemma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 868-874
- Palmer, E.L., and Martin, M.L. (1977). The Fine Structure of Reovirus Type 3. *Virology* **76**, 109-113
- Rager-Zisman, B., and Allison, A.C. (1973b). Effects of Immunosuppression on Coxsackie B-3 Virus Infection in Mice, and Passive Protection by Circulating Antibody. *J. Gen. Virol.* **19**, 339-351

- Rager-Zisman, B., and Allison, A.C. (1973a). The Role of Antibody and Host Cells in the Resistance of Mice Against Infection by Coxsackie B-3 Virus. *J. Gen. Virol.* **19**, 329-338
- Ramig, R.F., Mustoe, T.A., Sharpe, A.H., and Fields, B.N. (1978). A Genetic Map of Reovirus. II. Assignment of the Double-Stranded RNA-Negative Mutant Groups C, D, and E to Genome Segments. *Virology* **85**, 531-544
- Ramos-Alvarez, M., and Sabin, A.B. (1954). Characteristics of poliovirus and other enteric viruses recovered in tissue culture from healthy American children. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **87**, 655-661
- Rosen, L. (1960). Serologic grouping of reoviruses by hemagglutinin-inhibition. *Am. J. Hyg.* **71**, 243-249
- Rosen, L. (1962). Reoviruses in animals other than man. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **101**, 461-464
- Rubin, D.H. and Fields, B.N. (1980). Molecular Basis of Reovirus Virulence: Role of the M2 Gene. *J. Exp. Med.* **152**, 853-868
- Rubin, D.H., Weiner, H.L., Fields, B.N., and Greene, M.I. (1981). Immunologic tolerance after oral administration of reovirus: Requirement for two viral gene products for tolerance induction. *J. Immunol.* **127**, 1697-1701
- Sabin, A.B. (1959). Reoviruses: A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO-type 10 is described. *Science* **130**, 1387-1389
- Samuel, C.E. (1983). Biosynthesis of Reovirus-Specified Polypeptides; in: *Double-Stranded RNA Viruses* (eds. Compans, R.W., and

- Bishop, D.H.L.), Elsevier Biomedical, New York, Amsterdam, Oxford, pp 219-230
- Sharpe, A.H., and Fields, B.N. (1981). Reovirus Inhibition of Cellular DNA Synthesis: Role of the S1 Gene. *J. Virol.* **38**, 389-392
- Sharpe, A.H., and Fields, B.N. (1982). Reovirus Inhibition of Cellular RNA and Protein Synthesis: Role of the S4 Gene. *Virology* **122**, 381-391
- Shatkin, A.J., Furuichi, Y., LaFiandra, A.J., and Yamakawa, M. (1983). Initiation of mRNA Synthesis and 5'-Terminal Modification of Reovirus Transcripts; in: *Double-Stranded RNA Viruses* (eds. Compans, R.W., and Bishop, D.H.L.), Elsevier Biomedical, New York, Amsterdam, Oxford, pp 43-54
- Shelton, I.H., Kasupski, G.J., Oblin, C., and Hand, R. (1981). DNA binding of a nonstructural reovirus protein. *Can. J. Biochem.* **59**, 122-130
- Shields, D., and Blobel, G. (1977). Cell-free synthesis of fish prepro-insulin, and processing by heterologous mammalian microsomal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2059-2063
- Silverstein, S.C. (1976). The reovirus replicative cycle. *Ann. Rev. Biochem.* **45**, 375-408
- Skup, D., Zarbl, H., and Millward, S. (1981). Regulations of Translation in L-Cells Infected with Reovirus. *J. Mol. Biol.* **151**, 35-55
- Smith, R.E., Zweerink, H.J., and Joklik, W.K. (1969). Polypeptide Components of Virions, Top Component and Cores of Reovirus Type 3. *Virology* **39**, 791-810

- Stangl, E., Aschauer, W., Zähringer, J., and Hübner, G. (1986).
Reovirus myocarditis. Eur. Heart J. (Suppl. E), in press
- Stanley, N.F. (1961). Relationship of hepatoencephalomyelitis virus
and reoviruses. Nature **189**, 687-689
- Stanley, N.F. (1974). The Reovirus Murine Models. Progr. med. Virol.
18, 257-272
- Stewart, W.E.II.(1979). The Interferon System. Springer-Verlag,
Vienna, New York, pp 421
- Tillotson, J.R., and Lerner, A.M. (1967). Reovirus type 3 associated
with fatal pneumonia. N. Engl. J. Med. **276**, 1060-1063
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic
transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellu-
lose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl.
Acad. Sci. USA **76**, 4350-4354
- Vasquez, C., and Tournier, P. (1962). The Morphology of Reovirus.
Virology **17**, 503-510
- Ver Donck, L., Pauwels, P.J., Vandeplassche, G., and Borgers, M.
(1986). Isolated rat cardiac myocytes as an experimental
model to study calcium overload: The effect of calcium-entry
blockers. Life Sci. **38**, 765-772
- Walters, M.N.I., Joske, R.A., Leaks, P.J., and Stanley, N.F. (1963).
Murine infection with reovirus. I. Pathology of the acute
phase. Br. J. Exp. Pathol. **44**, 427-436
- Watanabe, Y., Prevec, L., and Graham, A.F. (1967). Specificity in
Transcription of the Reovirus Genome. Proc. Natl. Acad. Sci.

USA **58**, 1040-1046

Weiner, H.L., Drayna, D., Averill, D.R., and Fields, B.N. (1977). Molecular basis of reovirus virulence: Role of the S1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5744-5748

Weiner, H.L., and Fields, B.N. (1977). Neutralization of Reovirus: The Gene Responsible for the Neutralization Antigen. *J. Exp. Med.* **146**, 1305-1310

Weiner, H.L., Greene, M.I., and Fields, B.N. (1980 a). Delayed Hypersensitivity in Mice Infected with Reovirus. I. Identification of Host and Viral Gene Products Responsible for the Immune Response. *J. Immunol.* **125**, 278-282

Weiner, H.L., Powers, M.L., and Fields, B.N. (1980b). Absolute linkage of virulence and central nervous system cell tropism of reoviruses to viral hemagglutinins. *J. Infect. Dis.* **141**, 609-616

Willey, D.E., and Ushijima, R.N. (1981). The Effect of Thymosin on Murine Lymphocyte Responses and Corticosteroid Levels during Acute Reovirus Type 3 Infection of Neonatal Mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **19**, 35-43

Wilmes, E., und Wolf, H. (1981). Der Nachweis von Epstein-Barr-Virus- Genomen in der Ohrspeicheldrüse. *Laryng.-Rhinol.* **60**, 7-10

Zähringer, J., Stangl, E., Aschauer, W., and Van der Walt, M. (1985). Virus Myocarditis: Molecular Hybridization Allows the Detection of Virus-RNA in Heart Muscle after Virus Infection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **17**, 83-85

LEBENS LAUF

Name:	Elisabeth Anna Stangl
Geburtsdatum:	27.2.1953
Geburtsort:	Dachau
Eltern:	Josef Stangl Elisabeth Stangl, geb. Pfaffenzeller
1959 - 1965	Volksschule Odelzhausen
1965 - 1974	math. naturwiss. Gymnasium Dachau
1974	Abitur
WS 1974/1975	Beginn des Studiums Chemie/Diplom an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1977	Diplomvorprüfung
1980	Diplomhauptprüfung
Dez. 1980 - Sept. 1981	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. R. Grashey am Institut für Organische Chemie der Universität München
Seit 15.9.1982	beschäftigt als wiss. Mitarbeiter in der Med. Klinik I des Klinikums Großhadern, Universität München
April 1983 - Jan. 1986	Promotion am selben Institut
April 1986	Promotionsvorprüfung

